

11281

3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LEISHMANIAS
AISLADAS EN MÉXICO Y SU CORRELACION CON
LOS DIFERENTES CUADROS CLÍNICOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A :
MIRIAM DEL SOCORRO BERZUNZA CRUZ**

ASESOR: DR. INGEBOURG BECKER FAUSER

MEXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Ingeborg Becker Fauser.

El jurado para examen de grado estuvo formado por:

Dra Ana Flisser Steinbruch
Dr. Roberto Hernández Fernández
Dra. Ingeborg Becker Fauser
Dra. Patricia Talamás Rohana
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez
Dr. Oscar Velasco Castrejón
Dr. Marco Crippa Rossi

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

A mis padres: Carlos Manuel y Miriam, forjadores del hogar en que fragüe mi espíritu. Con todo mi amor.

A mis hermanos: Ramón Agustín y Carlos Rafael, alegrías de mi pasado, presente y futuro. Juntos por siempre.

A mis sobrinos: Carlos Agustín, Eduardo Jesús, y Miriam Guadalupe, esperanzas de un mañana lleno de alegrías.

Al Dr. Luis Eduardo Castillo Hernández, por apoyarme en todo momento.

A mis amigas: Por estar siempre a mi lado. Gracias por su amistad.

A la Divina providencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora: Dra. Ingeborg Becker, por su orientación y sabios consejos en el camino de la investigación.

A mis compañeros de laboratorio, Lucy, Sra. Susana y Ricardo, por su apoyo incondicional de todos los días.

Al Dr. Ruy Pérez Montfort, por permitir realizar parte de mi proyecto de investigación en su laboratorio. Mil gracias.

A la Dra Emma Saavedra Lira y a la Biol. Nallely Cabrera González, por su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

RESUMEN	3
I) INTRODUCCIÓN	5
A) FILOGENIA	5
B) AGENTE PATÓGENO	8
C) VECTOR	10
D) CICLO DE TRANSMISIÓN	11
E) SITUACIÓN MUNDIAL	12
F) LAS LEISHMANIASIS EN MÉXICO	13
G) CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	14
LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA (LCL)	14
LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA (LCD)	18
LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA (LMC)	19
LEISHMANIASIS VISCERAL O KALA-AZAR (LV)	20
LEISHMANIASIS ESPOROTRICOIDE (LE)	21
LEISHMANIASIS CUTÁNEA PSEUDODIFUSA (LCPD)	22
H) INMUNOLOGÍA DE LAS LEISHMANIASIS	24
INMUNIDAD INNATA	24
INMUNIDAD ESPECÍFICA	24
I) GENES DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA	25
J) ORGANIZACIÓN GENÓMICA	26
CINETOPLASTO	27
GENES DEL RNA ribosomal	28
K) HERRAMIENTAS DEL ANÁLISIS GENOTÍPICO	29

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
III) HIPÓTESIS	33
IV) OBJETIVOS	33
V) MATERIAL Y MÉTODOS	34
AISLAMIENTO DE LEISHMANIAS	34
PARÁSITOS	34
TIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS	35
OBTENCIÓN DEL kDNA	36
RFLP DEL kDNA	37
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS AISLADOS IN VITRO	37
PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO	38
PCR DE LAS REGIONES ITS Y 18S DEL GENE RNA RIBOSOMAL	39
RFLP DE LAS REGIONES ITS Y 18S DEL GENE RNA RIBOSOMAL	39
SECUENCIACIÓN DEL ITS	40
VI) RESULTADOS	42
VII) DISCUSIÓN	63
VIII) CONCLUSIONES	69
IX) REFERENCIAS	71

RESUMEN

En este estudio analizamos el polimorfismo genético de leishmanias aisladas de 23 pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, diseminada y una forma atípica denominada "pseudodifusa", provenientes de varias regiones endémicas de México. En el análisis incluimos cuatro especies de referencia del complejo *L. mexicana* de la OMS: *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana pifanoi* y *L. mexicana venezuelensis*. El análisis consistió en la caracterización taxonómica mediante anticuerpos monoclonales tipificadores de la OMS, el estudio del polimorfismo genético mediante RFLP con endonucleasas de restricción del DNA del cinetoplasto (kDNA), y RFLP de dos regiones del gen del rRNA: el espaciador transcrito interno (ITS) y el 18S. Se secuenció la región del ITS de las especies de referencia de la OMS del complejo *L. mexicana*, excepto *L. mexicana pifanoi*, y de algunos aislados mexicanos representativos de los distintos cuadros clínicos. También se realizó una cinética de crecimiento de los aislados mexicanos. Los resultados obtenidos con los anticuerpos tipificadores revelaron que los parásitos aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, diseminada y pseudodifusa incluidos en este estudio pertenecen a la especie *L. mexicana mexicana*. Los resultados obtenidos del RFLP del kDNA mostraron que la digestión con las enzimas *Hae* III, *Hpa* II, y *Mse* I generó patrones de restricción que pudieron ser clasificados en 6 grupos. Los parásitos aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada pertenecían a cinco de los grupos, los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada pertenecían a dos de los grupos, y aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa se clasificaron dentro de un solo grupo.

El análisis del polimorfismo de dos regiones en el gen del rRNA: el ITS y el 18S, de las especies de referencia del complejo *L. mexicana* y de los aislados mexicanos, reveló que la especie de referencia de *L. mexicana mexicana* y los aislados mexicanos tenían el mismo patrón de restricción en ambas regiones. Por otro lado, *L. mexicana amazonensis*

y *L. mexicana venezuelensis*, presentaron polimorfismo solo en el ITS en comparación a *L. mexicana mexicana*. El alto grado de similitud del ITS en *L. mexicana mexicana* fue confirmado mediante la secuenciación de esta región de tres aislados mexicanos y la especie de referencia de *L. mexicana mexicana*. El análisis de las secuencias del ITS reveló que *L. mexicana venezuelensis* tiene un alto porcentaje de similitud con los aislados de *L. major*.

Adicionalmente los parásitos aislados en México pudieron ser clasificados en grupos de crecimiento rápido y lento. Los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada presentaron un crecimiento rápido, mientras que aislados de pacientes con la forma localizada presentaron ambas formas de crecimiento. En contraste, todos los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa presentaron crecimiento lento.

En conclusión, encontramos que *Leishmania mexicana mexicana* presenta polimorfismo a nivel del kDNA que puede ser clasificado en 6 grupos, uno de los cuales es exclusivo de la forma clínica de la leishmaniasis cutánea pseudodifusa. Además los aislados de esta forma clínica provienen de la misma zona geográfica y presentan un solo patrón de crecimiento. Adicionalmente es el primer estudio que reporta la ausencia de polimorfismo a nivel del ITS dentro de *L. mexicana mexicana*, y que revela el alto grado de similitud entre *L. mexicana venezuelensis* y *L. major* a nivel del ITS, sugiriendo que ambas especies pueden estar relacionadas mas estrechamente de lo considerado con anterioridad.

I) INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una zoonosis parasitaria multifacética, cuyas manifestaciones clínicas, así como su severidad, dependen de las especies parasitarias que la inducen, el tipo de vector involucrado en la transmisión y la respuesta inmune del huésped (1).

Las leishmaniasis comprenden una amplia variedad de enfermedades causadas por un protozoo flagelado, del género *Leishmania*, el cual es transmitido desde un reservorio vertebrado por un artrópodo de la sub-familia Phlebotominae, perteneciente al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Muchas especies de mamíferos, tales como humanos, cánidos, roedores y perezosos son susceptibles a *Leishmania* y actúan como reservorios de la enfermedad (1-4).

A) FILOGENIA

Leishmania está incluida en el reino de los protistas de la siguiente manera:

Reino PROTISTA Haeckel, 1866

Subreino PROTOZOA Goldfuss, 1817

Phylum SARCOMASTIGOPHORA Honigberg-Balamuth, 1963

Subphylum MASTIGOPHORA Deising, 1866

Clase ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Orden KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963

Suborden TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Familia TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901

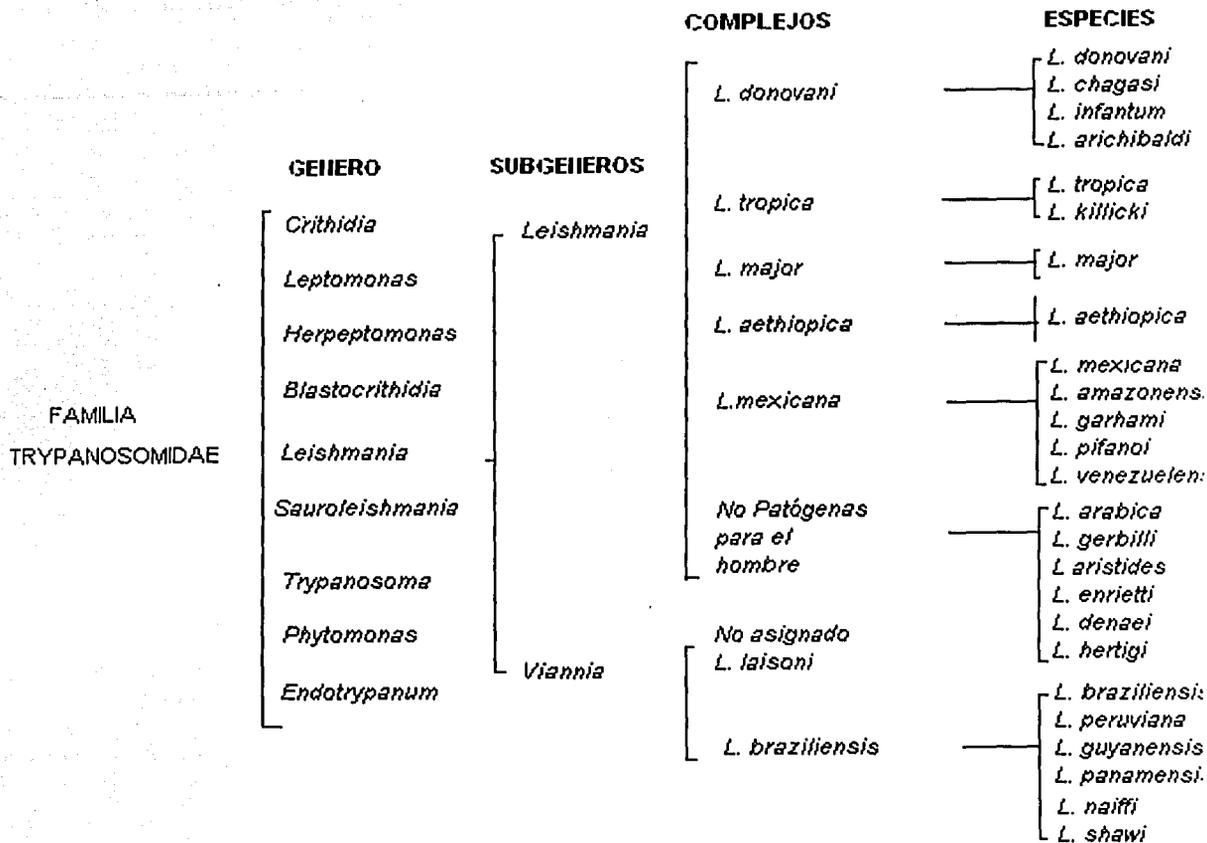
Género *Leishmania* Ross, 1903

La multiplicación de las distintas especies de *Leishmania* en las diferentes porciones del tracto digestivo de los vectores, hace que se puedan agrupar en hipo-, peri- y suprapilarias. Las primeras son las más primitivas desde el punto de vista evolutivo y están representadas en la actualidad por *Sauroleishmania spp*, cuya transmisión es por

contaminación fecal. Siempre están relacionadas a reptiles y sus orígenes se remontan al periodo Jurásico (5-8). En un punto intermedio en la escala filogenética se encuentran las leishmanias de multiplicación peripilórica, tanto en el intestino medio como en el posterior, agrupadas en el subgénero *Viannia*, todas del Nuevo Mundo. Las leishmanias del subgénero *Leishmania* se multiplican en las porciones suprapilóricas próximas a la probóscide, son parásitos de mamíferos, incluyendo al hombre (7).

La clasificación de *Leishmania* (tabla 1) no está definida totalmente por la dificultad de establecer el límite de especie en organismos cuya multiplicación probablemente no es sexual (o no es sexual de forma predominante), y por el hallazgo de nuevas especies patógenas. Recientemente Cupolillo y col. (2000), proponen la separación del género *Leishmania* en dos divisiones, *Euleishmania* y *Paraleishmania*. El primero comprendería los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, y el *Paraleishmania*: *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. colombiensis*, *L. equatoriensis*, *L. herreri* y *Endotrypanum* (9).

Tabla 1.- Clasificación del género *Leishmania*, basada en isoenzimas (10).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

B) AGENTE PATÓGENO

Las leishmanias, al igual que la mayoría de los parásitos protozoarios que se adaptaron de los invertebrados a los vertebrados, son organismos pleomórficos que presentan en los vertebrados su forma inmóvil aflagelada (amastigote) con localización intracelular, ovoide, de 2 a 5 μm de diámetro. En los invertebrados, se presenta la forma evolutiva, móvil y flagelada (promastigote) de morfología fusiforme, con longitud de 12 a 20 μm y un diámetro de 2.5 a 3.5 μm , de localización siempre extracelular en el tracto digestivo (10). Las células hospederas para la forma de amastigote son las células histiocitarias. Los amastigotes son células provistas de un núcleo con cariosoma central y un cinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote. Esta etapa sólo se observa en los tejidos de los vertebrados parasitados y algunas veces en medios de cultivo (figura 1).

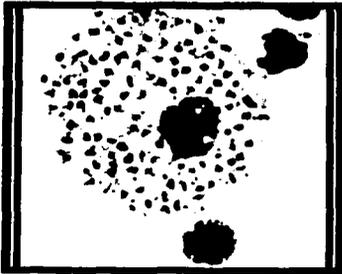


Fig. 1.- Amastigotes intracelulares.



Fig. 2.- Promastigote

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el vector (*Lutzomyia* en América) y en el cultivo, las leishmanias se presentan en forma de promastigote (figura 2), libres, alargadas y móviles gracias a un flagelo anterior. Tienen un núcleo situado aproximadamente en la parte central del parásito y un flagelo

anteronuclear, que nace de un cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto, sale del cuerpo por el polo anterior, y carece de membrana ondulante (10, 11). El cinetoplasto es una estructura rica en DNA que pertenece a la mitocondria única y grande existente en la célula (12).

La membrana celular es una bicapa lipídica, en su superficie se han identificado una serie de moléculas relacionadas con la capacidad invasiva del parásito. Las más abundantes son: la glicoproteína de 63 kilodaltons (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), las cuales se anclan a la membrana del parásito mediante glicosil-fosfatidil-inositol y se unen a los macrófagos por receptores, favoreciendo la penetración de *Leishmania* (13-16).

En cuanto a su reproducción, de forma general se acepta la multiplicación asexual (agamogonia) en *Leishmania*, la cual se realiza por bipartición longitudinal de los promastigotes (figura 3). Inicialmente se divide el cinetoplasto, seguido por el núcleo, luego el corpúsculo basal, y después se forma el flagelo. Después de la división nuclear se desdobra gradualmente la membrana externa dando origen a dos parásitos. Los amastigotes pueden dividirse por bipartición o por división múltiple (17).

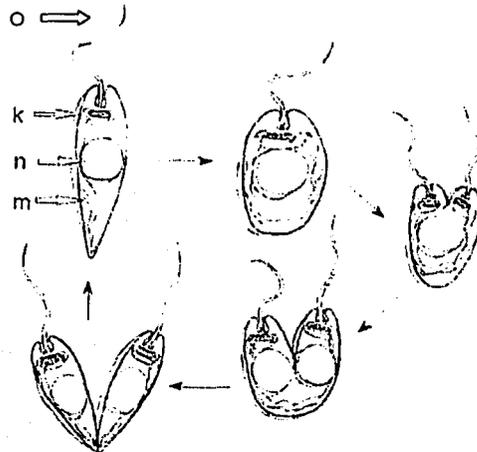


Fig. 3.- Reproducción de promastigotes por fisión binaria. (k. Cinetoplasto; n. Núcleo; m. Membrana; o. Flagelo)

C) VECTOR

Los vectores de la leishmaniasis son pequeños dípteros pilosos. En el Viejo Mundo, éstos pertenecen al género *Phlebotomus* y en América a *Lutzomyia* (figura 4). No hay evidencias concluyentes que especies de otros géneros (*Sergentomys*) puedan transmitir *Leishmania* al hombre (10, 11).

La primera relación entre las leishmaniasis y vectores flebotómicos fue descrita en 1764, cuando Cosme Bueno, implicó a estos vectores en la transmisión del "Uta", nombre con el que se le conoce comúnmente a la enfermedad en el Perú (18). En México, a los vectores se les llama "papalotillas", del nahuatl papalotl que significa mariposa, y en la Península de Yucatán "huetl" cuyo significado en Maya, es "algo minúsculo (casi invisible) que pica". En zonas no indígenas se les conoce como "jejenes", volviendo confusa su denominación ya que en amplias zonas de México se denomina así a *Culicoides spp* (19).



Fig. 4.- *Lutzomyia*, vector de la leishmania.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En vista de que las hembras hematófagas necesitan sangre para la maduración de los huevos, pueden picar al hombre, y después de haber succionado sangre depositan de 50 a 100 huevos en suelos húmedos que eclosionan en 8 a 10 días. Las larvas se encuentran en el sustrato de cuevas y grietas del terreno, paredes de piedra, siempre en

lugares sombreados y ricos en restos orgánicos de los que se alimentan. Son muy difíciles de localizar, se desarrollan hasta el estado adulto en 1 a 2 meses dependiendo de la temperatura. Las hembras son más activas durante el crepúsculo, aunque suelen picar también en el día cuando son molestadas por el ingreso del hombre a su medio ambiente. Esta actividad diurna juega un papel muy importante en la infección de los que trabajan el desmonte de la selva. Algunas especies como *nuñez-tovari* y *anglesi* entran en las casas por las noches y salen en la madrugada (11, 20).

El vuelo de las hembras no produce sonido audible por lo que su picadura no es advertida como en el caso de los mosquitos; realizan su traslación mediante vuelos cortos de aproximadamente 6-10 m, lo que les permite cubrir una corta área de ataque considerada como un perímetro de aproximadamente 300 m alrededor de sus criaderos (21).

D) CICLO DE TRANSMISIÓN

El ciclo de la transmisión requiere de un vector artrópodo y un reservorio mamífero.

Leishmania es un parásito digénico: realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedero invertebrado en forma flagelar (promastigote, del griego mastigos, látigo); y en el vertebrado dentro de los fagocitos mononucleares, sobre todo macrófagos, en forma de amastigote.

Leishmania pasa por una serie de etapas que inician cuando las hembras de *Phlebotomus* y *Lutzomyia* se alimentan del huésped vertebrado infectado. Ingieren sangre que contiene eritrocitos y macrófagos con amastigotes, los cuales se diferencian en el intestino medio abdominal experimentando varias divisiones y progresivamente cambian a formas alargadas llamadas promastigote nectomona (22, 23), el cual se encuentra anclado por un flagelo muy largo a las microvellosidades del tubo digestivo del flebótomo. El cuerpo mide 10 μm y tiene el cinetoplasto muy próximo al núcleo celular. Al avanzar hacia porciones anteriores del estómago, el cuerpo se redondea y el flagelo —rico en

lipofosfoglicanos— se acorta para facilitar su adhesión a las lectinas que revisten el tubo digestivo. En este estadio el cinetoplasto se encuentra en posición anterior, el parásito (promastigote haptomona) carece de capacidad infectiva y mide entre 6 y 12 μm de largo (24). Diez días después de haber entrado en el insecto, el promastigote pierde la adherencia por cambios del lipofosfoglicano, el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo fino y corto, hay una bolsa flagelar con vesículas exocíticas y material de secreción, deja de multiplicarse pero recupera la infectividad, y se sitúa ya de manera libre en la hipofaringe quedando así dispuesto para ser inoculado. Este estadio infectivo recibe el nombre de promastigote metacíclico (11, 17, 23, 25, 26).

Una vez que el promastigote ha sido inoculado a su hospedador vertebrado, el cinetoplasto tiene posición paralela al núcleo, la bolsa flagelar se hace muy profunda, el cuerpo se ovala y el flagelo empieza a reducir su tamaño; esta forma se llama paramastigote (27). Una vez que es fagocitado por el macrófago, el amastigote adquiere su forma típica durante las 24 horas subsecuentes. Los monocitos parasitados circulantes pueden ser ingeridos por otro flebótomo, en cuyo intestino se liberan los amastigotes que recuperan la forma de promastigotes con lo que se cierra el ciclo (2, 28).

E) SITUACIÓN MUNDIAL

En 1993 la Organización Mundial de la Salud estimó que la prevalencia global de enfermos con leishmaniasis es de 12 millones y la población en riesgo es del orden de 350 millones de personas. La incidencia parasitaria anual para la leishmaniasis cutánea es de 1 a 1.5 millones y la de la leishmaniasis visceral es de 500,000 nuevos casos por año. Anualmente mueren 80,000 personas en el mundo debido a esta parasitosis. Las leishmaniasis en sus diversas formas clínicas están presentes en todos los continentes excepto Australia y Antártica (1, 2).

F) LAS LEISHMANIASIS EN MÉXICO

Se cuenta con evidencias de que las leishmaniasis existían en México en la época precolumbina, ya que en su "Historia de Yucatán", Diego López de Cogolludo relata que los primeros Franciscanos que pretendieron catequizar a los Itzaes del Péten encontraron un gran número de indígenas con las "Orejas Podridas" (29-31). En 1927, Padilla Bolaños publicó el hallazgo de idolillos con las "Orejas Comidas", mutilaciones que no parecían debidas al tiempo, sino hechas ex profeso (29). En 1982 Martínez Marañón hizo una reseña similar de un idolillo olmeca que podría representar la leishmaniasis cutánea diseminada (32). En 1912, Seidelin describe por primera vez la leishmaniasis cutánea en México (Yucatán) en los trabajadores que extraían el chicle y en quienes observó lesiones ulcerosas predominantemente en las orejas. Esta era una de las principales actividades que se desarrollaban a principios de este siglo en el Sur de la Península de Yucatán, donde el árbol del chicle es muy abundante en los bosques tropicales lluviosos. De aquí el nombre común con que se conoce a la enfermedad en esta zona, que es el de "Úlcera de los Chicleros" (29, 33).

En México la leishmaniasis cutánea localizada es la forma clínica más frecuente, durante el periodo 1985 a 1994 se reportaron 4,885 casos. Entre 1995 y 1997 se registraron 4,404 casos. Debido al gran subregistro aún este número de pacientes solo representa una fracción de los casos reales.

Se estima que alrededor de dos millones de personas viven en áreas con riesgo de transmisión de la enfermedad. Entre las causas principales del aumento de casos y áreas afectadas se destacan: la adaptación de los ciclos de transmisión de las leishmanias al ambiente peridoméstico, la colonización de extensas áreas de bosque, la migración interna en busca de fronteras agropecuarias y la procedente de países centroamericanos (34, 35), así como el desarrollo de áreas turísticas en regiones tropicales (10).

Las leishmaniasis en México se distribuyen en 18 entidades, desde Coahuila y Tamaulipas por el Norte hasta la Península de Yucatán y Chiapas al Sureste. Los estados de Campeche, Chiapas, Nayarit, Quintana Roo y Tabasco son los más afectados. En algunas regiones constituye un serio problema de salud pública con un gran crecimiento del número de casos (10).

G) CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA (LCL)

Esta forma clínica también es conocida como “Úlcera de los Chicleros” y se caracteriza por una ulceración única (figura 5), aunque puede ser múltiple (figura 6) si el transmisor picó en forma repetida o cuando el hospedero fue picado simultáneamente por varios vectores. La lesión inicia con un pequeño nódulo pruriginoso que evoluciona hacia la ulceración, aunque algunas veces la lesión continúa siempre nodular y se transforma en una placa infiltrada o atrófica e inclusive se vuelve vegetante. La ulceración generalmente es redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e indolora, y aparece aproximadamente 15-20 días después de la picadura infectante. Se ha dicho que tiene inclinación a la curación espontánea, excepto cuando se localiza en oreja (figura 7), donde es crónica y mutilante (figura 8).

En la LCL la inmunidad no siempre es duradera, ya que puede ocurrir reinfección en aproximadamente el 10% de los enfermos. Los pacientes con LCL son sensibles a antígenos de *Leishmania* (leishmanina), prueba también conocida como Intradermoreacción de Montenegro (IDR).

En el Viejo Mundo, es causada principalmente por *L. major*, en el Nuevo Mundo es causada por leishmanias pertenecientes a los complejos *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Se ha reportado que la LCL causada por *L. major* es autolimitada con curación espontánea. Sin embargo la LCL causada por *L. mexicana* rara vez cura de manera espontánea pero

habitualmente es sensible al tratamiento con antimoniales pentavalentes como glucantime (2, 10). Ocasionalmente, *L. mexicana* puede producir grandes ulceraciones como observamos en viajes a áreas endémicas de Campeche y Tabasco (figuras 9 y 10), especialmente en casos en los cuales hay resistencia a los antimoniales pentavalentes.

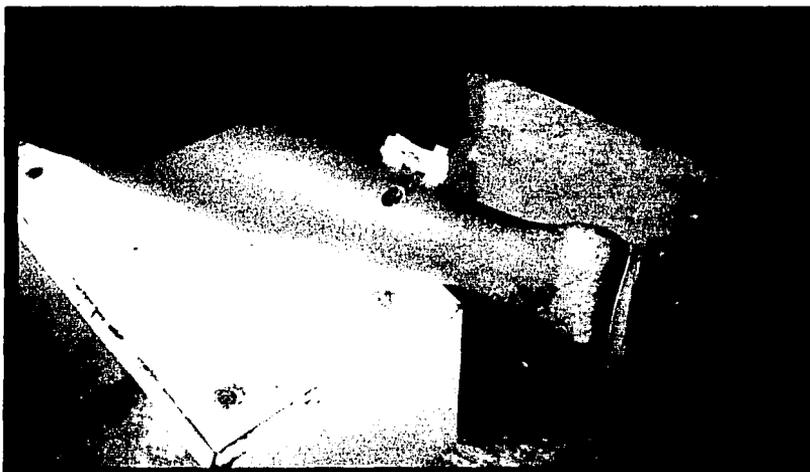


Fig. 5.- Lesión característica de LCL en una paciente mexicana

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 6.- Múltiples lesiones de paciente con LCL.



Fig. 7.- Lesión característica de la
"Úlcera de los Chicleros"



Fig. 8.- Mutilación de oreja en paciente con LCL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 9.- Lesión de gran tamaño observada en un paciente con LCL del estado de Campeche.

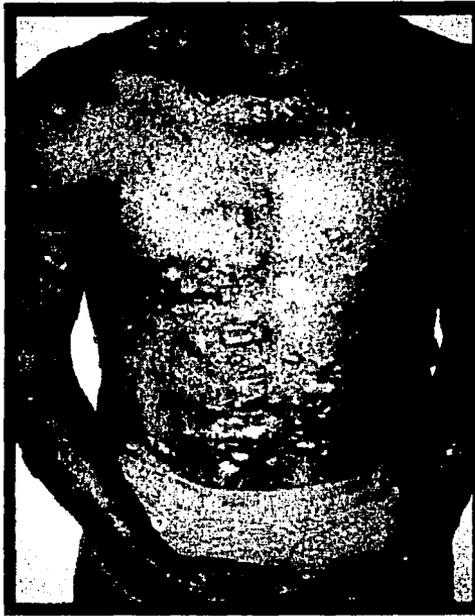


Fig. 10.- Lesiones de gran tamaño presentes en una paciente con LCL del estado de Tabasco.

LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA (LCD)

Se inicia habitualmente por un nódulo que no se ulcera y se disemina por vía linfática formando múltiples nódulos (figura 11). La enfermedad se caracteriza por producir lesiones no ulcerosas en piel de tipo papular y nodular, y grandes placas que pueden ser eritematosas, infiltradas o hipocrómicas que pueden llegar a ulcerar. Se encuentran parásitos abundantes dentro de macrófagos vacuolados, incluso en piel aparentemente sana. Las lesiones pueden ser de un solo tipo o ser una mezcla de dos o más de estos, son de crecimiento gradual, de diseminación lenta y progresiva hacia otras regiones de la piel sin evidencia clínica ni antecedentes de compromiso visceral.

Los parásitos llegan a colonizar prácticamente todo el tegumento con excepción del cuero cabelludo, región axilar e inguinal, palma de las manos, planta de los pies y genitales externos. Sin embargo en algunos pacientes mexicanos se han encontrado lesiones en genitales externos, planta de los pies y con frecuencia las mucosas orofaríngea y nasal. El paciente es anérgico a leishmanina (IDR negativa) y refractario a la quimioterapia. La infección puede ser causada por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo, pero la enfermedad causada por *L. mexicana mexicana* se observa en México y América Central, y *L. mexicana amazonensis* en Sudamérica (1, 2, 36, 37, 38).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 11.- Lesiones nodulares en un paciente con LCD.

LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA (LMC)

También conocida como espundia, presenta lesiones muy destructivas de las mucosas nasal y orofaríngea (figura 12), que pueden dificultar la fonación, la respiración e incluso causar inanición debido al intenso dolor. Los signos clínicos pueden sobrevenir después de una corta incubación (20 días). La lesión inicial está constituida por una ulceración cutánea con los bordes levantados poco dolorosa. Meses o años después pueden sobrevenir lesiones extensivas y mutilares. Es característica la afección de los labios, de los cartílagos de la nariz o de la oreja y de la mucosa de la orofaringe, dando el aspecto de la nariz de tapir con perforación o destrucción total del septo nasal. La afección esofágica, la alteración de la nutrición, las sobreinfecciones y los brotes extensivos pueden ser mortales. Estos pacientes son positivos a la IDR. *Leishmania braziliensis*

braziliensis es el agente etiológico más común, aunque también puede ser causada por otras subespecies de *Leishmania braziliensis*. Existen varios reportes de LMC causada por *L. braziliensis panamensis* (10, 11, 39-41).



Fig. 12.- Pacientes de LMC con lesión destructiva de mucosas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LEISHMANIASIS VISCERAL O KALA-AZAR (LV)

Es una enfermedad sistémica causada por la diseminación del parásito a través del sistema fagocítico mononuclear. Los parásitos son viscerotrópicos y rápidamente invaden este sistema a partir del sitio de inoculación cutánea. Afecta principalmente a niños entre 1 y 4 años (figura 14); el periodo de incubación oscila entre 10 días hasta más de un año. Después de esta fase silenciosa, la enfermedad inicia con una fiebre de evolución variable durante las primeras semanas. El síndrome general consiste en fiebre elevada ondulante que se acompaña de pérdida de peso, palidez que está relacionada con anemia, malestar general, anorexia, linfadenopatía, pancitopenia y hepatoesplenomegalia (figura 13, figura 14). También son frecuentes las adenopatías superficiales o profundas. La diarrea frecuente es debida a leishmanias en la mucosa intestinal. También es posible encontrar máculas eritematosas o hiperpigmentadas al igual que una púrpura. El oscurecimiento de

la piel y manos es común en la India (Kala-azar significa enfermedad negra) en tanto que en América Latina es ligero y esporádico.

Con frecuencia lleva a la muerte del paciente debido a un síndrome hemorrágico, o a infecciones bacterianas secundarias tales como neumonía, tuberculosis y disentería, si no se trata adecuadamente. La LV es causada por *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y por *L. chagasi* en el Nuevo Mundo (1, 2, 11, 42, 43).



Fig. 13.- Leishmaniasis visceral en un niño de 4 años.



Fig. 14.- Hepatoesplenomegalia en paciente con LV.

LEISHMANIASIS ESPOROTRICOIDE (LE)

En esta forma clínica los parásitos se diseminan a partir de una úlcera inicial a través de vías linfáticas a otras regiones cercanas a la lesión primaria, resultando en nódulos o adenopatía regional que simulan una esporotricosis linfocutánea. A esta forma clínica se le conoce como leishmaniasis esporotricoide. Los pacientes con esta forma clínica son positivos a la IDR y curan con el tratamiento específico. La LE en Arabia Saudita ha sido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

asociada a variaciones en isoenzimas de *L. major*, y en Sudamérica a *L. braziliensis panamensis* (44-50).

LEISHMANIASIS CUTÁNEA PSEUDODIFUSA (LCPD)

En algunos pacientes del estado de Tabasco se ha observado una modificación en la evolución clínica común del padecimiento. Los pacientes con LCPD tienden a presentar una diseminación lenta del parásito formando nódulos subcutáneos que siguen la trayectoria linfática. La evolución es muy crónica y de difícil tratamiento. Aunque los pacientes con LCPD simulan una LE en algunas características, se diferencian de esta forma clínica en otros aspectos, ya que cursan con anergia específica a antígenos de *Leishmania* por lo cual son negativos a la IDR y son refractarios a los antimoniales. Debido a que difiere de la LE, esta nueva forma clínica ha sido nombrada leishmaniasis cutánea pseudodifusa (figura 15) (51).

Fig. 15.- Paciente con LCPD.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las características clínicas y de las lesiones observadas en pacientes con las distintas formas clínicas de las leishmaniasis cutáneas se resumen en la tabla 2.

Tabla 2.- Cuadro comparativo de las leishmaniasis cutáneas.

	LCL	LCD	LCPD	LE
LESIÓN	ÚNICA O MÚLTIPLE PEQUEÑAS O GRANDES SEGÚN LA ESPECIE INFECTANTE EN MÉXICO ALGUNAS SON GRANDES	MÚLTIPLE	MÚLTIPLE	MÚLTIPLE
LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN	SITIO DE INFECCIÓN	TODO EL CUERPO EXCEPTO CUERO CABELLUDO, GENITALES EXTERNOS, PALMA DE LAS MANOS Y PLANTA DE LOS PIES. EN MÉXICO SE HAN ENCONTRADO EN GENITALES Y PLANTA DE LOS PIES	SITIO DE LA INFECCIÓN CON LESIONES SUBCUTÁNEAS CERCANAS A LA LESIÓN PRIMARIA QUE SIGUEN LA TRAYECTORIA DE VASOS LINFÁTICOS.	SITIO DE LA INFECCIÓN CON LESIONES SUBCUTÁNEAS CERCANAS A LA LESIÓN PRIMARIA QUE SIGUEN LA TRAYECTORIA DE VASOS LINFÁTICOS.
TIPO DE LESIÓN	ÚLCERA	NÓDULOS DISEMINADOS A TODO EL TEGUMENTO	ÚLCERA Y NÓDULOS SUBCUTÁNEOS	ÚLCERA Y NÓDULOS SUBCUTÁNEOS
INVASIÓN DE MUCOSA	NO INVOLUCRA MUCOSAS	NO INVOLUCRA MUCOSAS EN MÉXICO DISEMINA A MUCOSAS.	NO INVOLUCRA MUCOSAS	NO INVOLUCRA MUCOSAS
PRESENCIA DE ORGANISMOS (ASPIRADO)	+++ LESIÓN TEMPRANA +/- LESIÓN ANTIGUA	ABUNDANTE +++++	ABUNDANTE +++++	?
CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS <i>IN VITRO</i>	RÁPIDO	RÁPIDO	LENTO	DESCONOCIDO
TÍTULOS DE ANTICUERPOS	1:8	≥1:64	1:8	1:16
PRUEBA DE MONTENEGRO (IDR)	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO	CURA EN MÉXICO ALGUNOS SON RESISTENTES AL TRATAMIENTO	NO CURA	NO CURA	CURA

H) INMUNOLOGÍA DE LAS LEISHMANIASIS

INMUNIDAD INNATA

Una vez que el promastigote ha sido inoculado a su hospedador vertebrado, este es fagocitado por los macrófagos mediante receptores del complemento (CR-1, CR-3), a fibronectina y a manosa. El macrófago desempeña una triple función en esta parasitosis: es una célula con capacidad de matar a leishmanias fagocitadas, es presentadora de antígenos para activar el sistema inmune específico y es productora de citocinas. El promastigote fagocitado se transforma en amastigote. El amastigote, se aloja en la vacuola parasitófora del macrófago, el cual trata de eliminarlo mediante una cascada de intermediarios reactivos del oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , $-OH$ y O_1^2) y la liberación de hidrolasas lisosomales, todos ellos vertidos en el espacio intravacuolar. También libera óxido nítrico (NO). Este es un compuesto formado a partir del grupo guanidina de la L-arginina, mediante la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). La regulación de su expresión es mediada por varias citocinas, siendo el interferón gamma (IFN- γ) el principal agente inductor del NOS. El factor transformante de crecimiento (TGF- β) es inhibidor de la inducción del NOS (52) y se ha correlacionado su presencia con la susceptibilidad a la leishmaniasis. Además de su papel leishmanicida, el macrófago presenta antígenos de leishmania en contexto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) activando los linfocitos T CD4+, y en combinación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) con activación de linfocitos T CD 8+ (52, 53).

INMUNIDAD ESPECÍFICA

La inmunidad específica anti-*Leishmania* es mediada por la inmunidad celular y la inmunidad humoral. La inmunidad celular esta mediada por linfocitos T. Los linfocitos T CD4+ se diferencian en dos subclases funcionalmente distintas, caracterizadas por el perfil de citocinas que producen. Las células de tipo Th1 se caracterizan por la producción

de IL-2, IFN- γ y factor de necrosis tumoral (TNF- α) los cuales son activadores del macrófago. Por otro lado, en la respuesta Th2 hay producción de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. La respuesta Th2, promueve una activación de linfocitos B con la formación consiguiente de anticuerpos (54-57). Se ha demostrado que la respuesta protectora frente a *Leishmania* está basada en células CD4+ Th1, así como en los linfocitos CD8+. Los CD8+ participan como células citotóxicas y como células productoras de citocinas activadoras de macrófagos, como IFN- γ (58, 59).

La inmunidad humoral en los pacientes con leishmaniasis se desarrolla desde una etapa temprana de la enfermedad y se mantiene durante el curso de la infección. El papel de los anticuerpos en la leishmaniasis no es protector sino mas bien facilitador, ya que la opsonización de leishmanias facilita la fagocitosis por los macrófagos, que son su célula hospedera.

I) GENES DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA

Al parecer factores genéticos del huésped tienen un papel importante en la evolución de la infección por *Leishmania*. Se ha visto en ratones que la resistencia en fases tempranas de la infección a varios patógenos intracelulares (*Leishmania donovani*, *Mycobacteria* y *Salmonella typhimurium*), está bajo el control del gen NRAMP 1 (natural resistance associated macrophage protein 1). Este gen, que es expresado en macrófagos, ejerce varios efectos, tales como la producción de algunas citocinas, el estallido oxidativo, la captación de L-arginina, y la producción del óxido nítrico en respuesta a activadores del macrófago como el IFN- γ . Este gen se asocia a la capacidad de los macrófagos de controlar el crecimiento intracelular de diferentes parásitos; mutaciones en el gen de esta proteína se han correlacionado con la susceptibilidad a infecciones.

Además, estudios en ratón sugieren que tres locus (*lmr1*, *lmr2*, y *lmr3*) actuando conjuntamente y con efectos epistáticos, pueden ser responsables de la susceptibilidad del ratón hacia la infección por leishmania (60-62).

J) ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida presentan un DNA genómico localizado en el núcleo celular, encargado de la replicación del parásito, y un DNA extracromosómico situado en la única mitocondria, que se replica independientemente, llamado DNA del cinetoplasto (kDNA). El tamaño del genoma en *Leishmania* es aproximadamente de 3.55×10^7 pb y esta constituido de 34 a 36 cromosomas que poseen repetitivas secuencias teloméricas (63-65).

El sexo y ploidía en el genoma de *Leishmania* han sido temas de mucha especulación, para algunos autores la haploidía es la norma, aunque en algunas especies se presenta diploidía e, incluso, aneuploidía. Para otros autores, la estructura es típicamente diploide, con dos juegos de cromosomas idénticos lo que supondría un intercambio de material entre dos células, es decir algo cercano a la sexualidad (66, 67). Estudios de genética de poblaciones indican que dos consecuencias de la reproducción sexual, la segregación y la recombinación no están presentes en *Leishmania*, por lo que se ha propuesto un modelo clonal. Este modelo no implica la completa ausencia de reproducción sexual (68-70).

Los cromosomas de *Leishmania* presentan "plasticidad del genoma" que se manifiesta en variaciones en el número y tamaño de los cromosomas. Cromosomas homólogos varían en tamaño no solo entre las especies sino incluso en clones de una misma especie (64, 71).

En el genoma de *Leishmania*, además de su dotación cromosómica, se han identificado elementos genéticos circulares de 30 a 200 kilobases llamados minicromosomas. Pueden

originarse espontáneamente o como respuesta a condiciones adversas como la selección a drogas, y son el resultado de la amplificación de secuencias genómicas (72, 73).

En *Leishmania* existe un considerable grado de heterogeneidad en la organización y expresión de genes. El genoma tiene secuencias repetidas de DNA y un 58 a 60% de G/C (65).

CINETOPLASTO

Es una estructura que poseen los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida, se localiza dentro de la membrana mitocondrial. Es un disco visible al microscopio óptico que contiene 10^7 pares de bases de DNA mitocondrial o kDNA. El kDNA representa hasta el 20% de todo el DNA del parásito y está formado por una compleja red de miles de moléculas circulares, maxicírculos y minicírculos, concatenadas covalentemente. El kDNA contiene unos 50 maxicírculos de 20 a 38 kb los cuales poseen una región conservada y otra variable. Se les atribuye la misma función que al DNA mitocondrial de otros sistemas celulares, pues codifican por RNAs codificadores de proteínas, RNAs ribosomales y de transferencia mitocondriales (74, 75).

Los minicírculos son las moléculas más pequeñas del kDNA, con un tamaño que oscila entre 450 y 2500 pb dependiendo de la especie (en especies de *Leishmania* varia de 0.7 a 0.9 kb) y se encuentran en varios cientos de copias. Los minicírculos forman parte de la estructura y replicación del propio kDNA. El kDNA contiene de 10,000 a 20,000 minicírculos los cuales poseen una secuencia variable en el 80% de su longitud y unos 120 pb conservados. Las distintas especies de *Leishmania* agrupan de ocho a veinte familias de minicírculos, de acuerdo a su tamaño (76, 77).

El estudio del kDNA ha demostrado ser una valiosa herramienta para la discriminación entre diferentes especies y subespecies (78-83).

GENES DEL RNA ribosomal

La diversidad molecular dentro especies de *Leishmania* ha sido analizada por varios métodos (84-88), y la comparación de las secuencia de los genes del RNA ribosomal (rRNA) ha sido utilizada en estudios filogenéticos (89-98). En *Leishmania* se encuentran entre 150 y 200 copias de los genes ribosomales (99).

En kinetoplastidas estos genes son altamente conservados, se encuentran en unidades repetidas dispuestas en tándem de ~10 Kb (100). Están subdivididos en tres regiones codificantes y en cuatro regiones no codificantes o espaciadores (figura 16). Las regiones codificantes son el gen 18S o subunidad pequeña (SSU del ingles Small SubUnit), el gen 5.8S, y el gen 28S o subunidad grande (LSU de Large SubUnit). El 28S está dividido en dos RNAs mayores (28S α y 28S β) y cuatro RNAs menores de ~220, 180, 140 y 70 nts que son altamente conservados dentro de las especies (101-104).

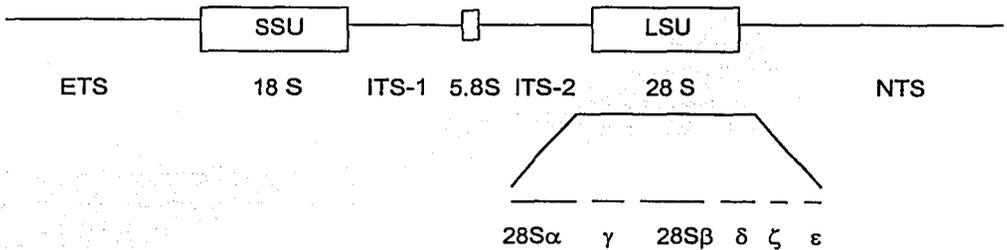


Fig. 16.- Organización del gen rRNA en tripanosomátidos.

Los espaciadores son: 1) el espaciador transcrito externo (ETS del ingles External Transcribed Spacer), localizado antes del 18S; 2) los espaciadores transcritos internos (ITS de Internal Transcribed Spacer), que son eliminados durante la maduración del rRNA, incluyen: a) ITS-1 entre el gen 18S y el 5.8S; y b) ITS-2 entre el gen 5.8S y el gen 28S; 3) el espaciador no transcrito (NTS de Non Transcribed Spacer, también conocido

como IGS de InterGenic Spacer) que separa copias adyacentes de cada unidad repetida de DNA ribosomal (105, 106).

Entre las especies, las regiones del ITS son menos conservadas que los genes del rRNA, por lo tanto son utilizados convenientemente para la caracterización filogenética de las diferentes especies del mismo género (107). Davila y Momem postulan que la región del ITS tiene la suficiente variación para discriminar entre especies dentro del género *Leishmania* (108). De las especies americanas únicamente se ha estudiado la región del ITS en especies pertenecientes al complejo *L. braziliensis*, el otro gran complejo americano de *Leishmanias*. Cupolillo, estudiando la región del ITS del subgénero *Viannia*, encontró que las especies *L. (V.) naiffi* y *L. (V.) braziliensis* son altamente polimórficas, mientras que otras especies del mismo subgénero no presentan polimorfismo (97).

El gen 18S es una de las regiones más estudiadas y ha sido secuenciado para más de 100 especies incluyendo *Leishmania donovani*, *Leishmania tarantolae*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Crithidia fasciculata* (89, 91, 93, 109-111). Varios estudios indican que la región del 18S es conservada desde el punto de vista filogenético en el orden Kinetoplastida (91, 93, 109, 110, 112, 113). Van Eys y col. secuenciaron una parte central del gene rRNA 18S de nueve especies diferentes de *Leishmania*, *T. brucei*, *T. cruzi* y *C. fasciculata*, detectaron diferencias considerables y agruparon a los organismos dependiendo de estas secuencias: *Leishmania* por un lado, y *Crithidia* y *Trypanosoma* por el otro. Dentro de las especies de *Leishmania* encontraron solo mutaciones puntuales en la región central del 18S, y una homología con *Crithidia* del 89% y con *Trypanosoma* solo del 54% (113).

K) HERRAMIENTAS DEL ANÁLISIS GENÓTIPO

Una de las herramientas utilizadas en el estudio del polimorfismo genético es el análisis mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) con endonucleasas de

restricción. Las endonucleasas de restricción (ER) son enzimas que reconocen secuencias específicas en el DNA de doble cadena y cortan ambas hebras de la molécula. Las bacterias utilizan estas endonucleasas como sistema de defensa frente a los bacteriófagos ya que el DNA propio no se corta, debido a que las secuencias que reconocen las ER están metiladas y, por tanto, protegidas del corte.

Existen distintos tipos de ER según sea el tipo de secuencia reconocida y el lugar de corte. Las que tienen una aplicación más generalizada en el diagnóstico molecular son las de tipo II que reconocen secuencias palindrómicas de entre 4 y 8 nucleótidos (secuencias que se leen igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda) y cortan el DNA en la secuencia reconocida (figura 17).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

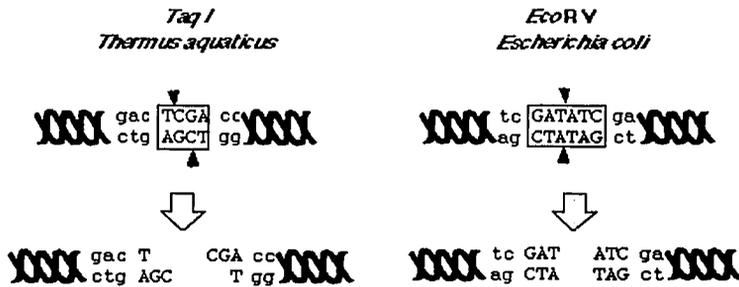


Fig. 17. Actividad endonucleasa de las ER *Taq I* (obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) y *EcoR V* (obtenida de la enterobacteria *Escherichia coli*). Ambas enzimas cortan el DNA produciendo fragmentos con extremos cohesivos o romos respectivamente.

Este tipo de enzimas tiene una gran especificidad por una secuencia y el cambio de un solo nucleótido produce la pérdida de reconocimiento.

Se han purificado múltiples nucleasas de restricción de diferentes especies de bacterias y en la actualidad se conocen más de 500 diferentes. El análisis de los fragmentos de DNA

generados por la digestión con enzimas de restricción se realiza mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. El método se basa en que a pH neutro o alcalino, los grupos fosfato del DNA confieren a las moléculas una carga neta negativa y uniformemente distribuida. Así, para moléculas de DNA de la misma conformación sometidas a unas mismas condiciones electroforéticas, la velocidad de migración sólo va a depender de su tamaño, puesto que las moléculas más grandes tendrán más dificultad para atravesar los poros del gel que las más pequeñas. De esta manera se presenta un patrón de bandas que recuerda las huellas dactilares (fingerprint). La cantidad de bandas indica la proximidad o lejanía filogenética entre las especies en estudio (114, 115).

II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El parásito *Leishmania* puede producir manifestaciones clínicas muy variables, desde una forma relativamente benigna de lesiones cutáneas localizadas, hasta un polo radicalmente opuesto con las formas más severas del padecimiento, que son de difícil tratamiento, evolución crónica, altamente desfigurantes y de pronóstico grave, como ocurre en la leishmaniasis cutánea diseminada. En un punto intermedio entre la leishmaniasis cutánea localizada y la leishmaniasis cutánea diseminada se encuentra la leishmaniasis cutánea pseudodifusa.

En México hay pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea diseminada y leishmaniasis cutánea pseudodifusa, y se ha observado que existe una gran variación en la susceptibilidad al tratamiento y en la severidad de la evolución clínica en algunos de los pacientes estudiados. La causa de la variabilidad del cuadro clínico puede ser debido a la respuesta inmune del hospedero o bien a factores intrínsecos del parásito. La respuesta inmune del hospedero ha sido estudiada exhaustivamente, sin embargo se sabe muy poco sobre factores del parásito que intervienen en la diversidad de los cuadros clínicos. En este trabajo realizamos un análisis genotípico comparativo de las leishmanias aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea diseminada y leishmaniasis cutánea pseudodifusa.

III) HIPÓTESIS

La diversidad de los cuadros clínicos observadas en pacientes con leishmaniasis se debe a variaciones genéticas intraespecie de leishmanias aisladas en México.

IV) OBJETIVOS

- 1.- Aislar parásitos de pacientes con las diferentes formas clínicas que radican en las distintas zonas endémicas de México.
- 2.- Tipificar la especie de los parásitos aislados mediante anticuerpos monoclonales.
- 3.- Buscar variaciones genéticas intraespecie mediante polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLP) del DNA del cinetoplasto de los aislados mexicanos, de especies de referencia de *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* y correlacionarlas con los cuadros clínicos.
- 4.- Realizar una cinética de crecimiento *in vitro* de cada aislado.
- 5.- Analizar el polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción de dos regiones del gene rRNA: el ITS y el 18S, en los parásitos utilizados en este estudio.
- 6.- Secuenciar la región del ITS de aislados representativos de los diferentes cuadros clínicos y de especies de referencia del complejo *L. mexicana*.

V) MATERIAL Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE LEISHMANIAS

Para poder aislar las leishmanias, el proyecto se sometió a la comisión de ética de la Secretaría de Salud de cada estado y se obtuvo el consentimiento por escrito de los pacientes. El aislamiento del parásito se realizó en pacientes con diagnóstico positivo confirmado mediante la intradermoreacción de Montenegro o por observación parasitoscópica. Para el aislamiento, se procedió de las siguientes maneras: se inyectaron 50 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4 estéril en el borde activo de la lesión (previamente desinfectada con benzal), se aspiró material de la misma, y se inoculó en tubos de cultivo con RPMI 1640 enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10%. En el transcurso de 4 días los amastigotes intracelulares se recuperaron en forma de promastigotes móviles y con estos se estableció un cultivo del aislado. En caso de no contar con condiciones estériles, el aspirado de la lesión se inoculó en los cojinetes plantares de las patas traseras de animales susceptibles a leishmania (BALB/c o hamster), se esperó hasta la aparición de una lesión en el lugar de la inoculación, se aspiró material de la misma y se inoculó en tubos con medio de cultivo. Otra manera consistió en la toma de una pequeña biopsia (con sacabocado) del borde activo de la lesión, la cual se colocó en tubos de cultivo o bien se trituró y se inoculó a animales susceptibles (1).

PARÁSITOS

Se incluyeron 24 aislados de parásitos obtenidos de pacientes con diagnóstico de leishmaniasis cutánea localizada (trece), leishmaniasis cutánea diseminada (cinco) y leishmaniasis cutánea pseudodifusa (seis), originarios de distintos estados del país en donde *Leishmania* es endémica (Campeche, Chiapas, Nayarit, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz). También se obtuvieron especies de referencia de la OMS del complejo *L.*

mexicana (tabla 3) donadas por la Dra. Nancy Saravia del CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas) de Cali, Colombia.

Tabla 3.- Especies de referencia de la OMS del complejo *L. mexicana*, utilizadas en este estudio.

ESPECIE DE REFERENCIA	CODIGO INTERNACIONAL
<i>L. m. mexicana</i>	R/BZ/1962/M379
<i>L. m. venezuelensis</i>	MHOM/VE/80/PMH3
<i>L. m. amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8

Para descartar la posibilidad de tener polimorfismo debido a la presencia de 2 especies distintas en un paciente, se clonaron dos de los aislados (MHOM/MX/94/INDRE CGM y MHOM/MX/98/UNAM RR) *in vitro* por dilución limitante en placas de 96 pozos. Los pozos que contenían solo un parásito recibieron 200 µl de 1 X RPMI. Los cultivos se incubaron a 26°C hasta que el crecimiento alcanzó una densidad de 5×10^6 promastigotes/ml. Las clonas fueron subcultivadas y criopreservadas.

TIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

Los aislados fueron tipificados mediante anticuerpos monoclonales donados por el Dr. Farrokh Modabber del Leishmania Vaccine Steering Committee, World Health Organization (WHO) Geneva, Switzerland, y posteriormente fueron enviados al CIDEIM para confirmar el diagnóstico de la especie mediante isoenzimas.

Los anticuerpos monoclonales usados fueron: M8 (*L. mexicana*), 2F7D3 (complejo *L. braziliensis*), G2D10 (control positivo) y 1H6-E3-B4 (control negativo) (42, 116).

Los promastigotes de 4 días de cultivo se lavaron con PBS, por centrifugación a 2,500 x g durante 10 min y se resuspendieron en este amortiguador a una concentración de 10^6 a 10^7 /ml. Se colocaron 10-15 μ l equivalentes a 10^4 - 10^5 parásitos en un portaobjetos, se dejaron secar y se fijaron con acetona (grado histológico) durante 5 min. Los portaobjetos se lavaron con PBS, se incubaron durante dos periodos de 10 min cada uno con PBS-SFB al 5%. Se agregaron los anticuerpos monoclonales (de manera individual) en una dilución 1:1000 a los portaobjetos y se colocaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min, se lavaron brevemente varias veces con PBS-SFB al 2%. Se agregó el anticuerpo secundario (FITC-Conjugated Rabbit-AntiMouse. Immunoglobulins, DAKO) y los portaobjetos se colocaron nuevamente en cámara húmeda durante 30 min a temperatura ambiente y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss).

OBTENCIÓN DEL kDNA

El kDNA se purificó mediante gradientes de cloruro de cesio. Aproximadamente 10^9 promastigotes se lavaron 3 veces con PBS pH 7.2, a 2,500 x g durante 10 min. Los promastigotes se lisaron en 2 ml de amortiguador de lisis (NaCl 0.15 M, $C_6H_5Na_3O_7$ 0.015 M pH 7.2, Sarkosyl 1%), y se incubaron 15 min a 37°C. El lisado se pasó varias veces a través de una aguja 18G. En un tubo de polialómero siliconizado se colocaron 2 ml del lisado sobre 6.6 ml de CsCl 3 M (en Na_2 - EDTA 0.01 M, pH 7.2) y 1 ml de CsCl 6 M (en Na_2 - EDTA 0.01 M, pH 7.2). El kDNA fue sedimentado por centrifugación en un rotor SW 40ti a 27,000 x g durante 30 min a 5°C. Posterior a la centrifugación se aspiraron el lisado celular y 2 ml del CsCl 3 M los cuales se descartaron. El kDNA presente en el tubo se lavó 3 veces con la siguiente técnica: se agregaron 3 ml de SSC 1X (0.15 M NaCl, 0.015 M $C_6H_5Na_3O_7$, pH 7.2) bajo agitación vigorosa, se centrifugó a 27,000 x g durante 30 min a 5°C y se eliminaron 4 ml del sobrenadante por aspiración los cuales se reemplazaron nuevamente con 4 ml de SSC 1X. Después del último lavado se decantó el sobrenadante,

y los tubos se invirtieron durante 10 min. El botón conteniendo el kDNA se resuspendió en amortiguador TE: Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM (79).

RFLP DEL kDNA

Se digirieron 0.5 µg del kDNA (obtenido mediante gradientes de cloruro de cesio) con 5 unidades de cada una de las siguientes enzimas de restricción: *Alu* I, *Apa* I, *Dra* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Kpn* I, *Mbo* I, *Mse* I y *Rsa* I (GIBCO BRL) (78, 79), usando los amortiguadores apropiados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las digestiones se realizaron en un volumen total de 10 µl, a 37°C durante toda la noche. Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) a 70 V, se tiñeron durante 1 min con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se fotografiaron bajo luz UV. Cada fragmento de restricción producto de la digestión se analizó cualitativamente comparando visualmente la posición relativa de cada banda con las otras bandas. Lo anterior se realizó con todos los parásitos aislados de pacientes con los distintos cuadros clínicos y con las especies de referencia.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS AISLADOS *IN VITRO*

Se cultivaron 1×10^6 promastigotes de cada aislado en 2 ml de RPMI 1640 enriquecido con SFB al 5%. A las 96 h, se tomó una alícuota de 50 µl a la cual se añadió 50 µl de glutaraldehído al 0.1% para fijar los parásitos. Se contaron los parásitos por ml en un hemocitómetro y se aplicó la siguiente fórmula: Número de parásitos X dilución X 10,000 X volumen (ml).

La cinética se realizó por triplicado. La significancia estadística de las diferencias en la velocidad de crecimiento entre los diferentes aislados se determinó mediante la t de Student.

PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO

Los promastigotes ($3-5 \times 10^9$) se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a $2,500 \times g$ durante 10 min a 4°C . El botón obtenido se lisó a temperatura ambiente con Tris 150 mM pH 7.5, EDTA 50 mM, pH 8.0, Sarkosyl 1 % (1 ml por 10^9 parásitos) durante 30 min en agitación constante. Se agregó proteinasa K a una concentración final de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se incubó a 55°C durante 2 hrs. Se realizaron dos extracciones de DNA, agregando v/v fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), en agitación durante 15 min y se centrifugó durante 10 min a $2500 \times g$, se tomó la fase acuosa y se agregaron 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío. El tubo con DNA en precipitación se guardó 30 min a -20°C . El DNA precipitado se separó con una pipeta pasteur y se colocó en TE. Después de una incubación secuencial con RNasa y proteinasa K, el DNA se separó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se precipitó con etanol absoluto frío. El DNA se lavó en etanol al 75% por centrifugación a $5000 \times g$ durante 5 min, se secó, y finalmente se solubilizó en agua ultra pura. El DNA extraído se utilizó para amplificación por PCR (112, 117).

OLIGONUCLEOTIDOS SINTETIZADOS PARA PCR DEL ITS Y 18S

Para la amplificación por PCR del ITS 1, 5.8S, e ITS 2 se usaron los oligonucleótidos designados por Cupolillo (97): IR1 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3'), corresponde a los 32 nucleótidos finales de las secuencias conservadas del 3' de la SSU e IR2 (5'-GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3') que consiste en los primeros 30 nucleótidos complementarios del 5' de la LSU de las secuencias de *T. brucei*, *T. cruzi* y *C. fasciculata*. Para la amplificación del gene rRNA 18S se usaron los oligonucleótidos S1 y S5 diseñados por Uliana y col. (112) de acuerdo a la secuencia rRNA 18S de *L. donovani* (109). El oligonucleótido S1 (5'-GATCTGGTTGATTCTGCCAG-3') corresponde a los primeros 20 nucleótidos del 5', y el S5 (5'-CTCCCGTGTTCCTTGT-

3') corresponde a 17 nucleótidos complementarios a la secuencia localizada a 780 pb del 5' del rRNA 18S.

Los oligonucleótidos fueron donados por el Dr. Paolo Dotto de Harvard School of Medicine.

PCR DE LAS REGIONES ITS Y 18S DEL GENE RNA ribosomal

La reacción de PCR para ambas regiones se realizó en 100 µl totales de la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM; 125 µM de cada dATP, dCTP, dTTP y dGTP; 200 ng de cada oligonucleótido; 10 ng de DNA genómico y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (GIBCO BRL). La amplificación se realizó en un termociclador Perkin-Elmer 2400, bajo diferentes condiciones de amplificación de acuerdo a los oligonucleótidos usados. Para IR1 e IR2: 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 2 min a 72°C, precedidas por un ciclo de 5 min a 95 °C en ambos casos (97, 112). Para S1 y S5: 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 38°C y 2 min a 72°C.

RFLP DE LAS REGIONES ITS Y 18S DEL GENE RNA ribosomal

La calidad de la amplificación por PCR se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 60V. Los productos de PCR del ITS y 18S se extrajeron con un kit de extracción (concert rapid PCR purification system, GIBCO BRL) y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 60V. Las regiones amplificadas del DNA se analizaron mediante enzimas de restricción.

Para el análisis por RFLP se digirieron aproximadamente 100 ng del DNA amplificado con 5 unidades de cada una de las siguientes ER: *Alu I*, *Cfo I*, *EcoR I*, *Hae III*, *Hpa II*, *Mbo I*, *Tha I* y *Rsa I* para el ITS; y *Alu I*, *Cfo I*, *Dra I*, *Hae III*, *Hinc II*, *Hpa II* y *Tha I* (GIBCO, BRL) para la región 18S. Las digestiones se realizaron en un volumen total de 10 µl, a 37°C durante toda la noche y los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en

geles de agarosa al 1.5% a 60V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y fueron fotografiados bajo luz UV.

Cada fragmento de restricción producto de la digestión se analizó cualitativamente comparando visualmente la posición relativa de cada banda con las otras bandas. Lo anterior se realizó con todos los parásitos aislados de pacientes con los distintos cuadros clínicos y con las especies de referencia.

SECUENCIACIÓN DEL ITS

Con la finalidad de fortalecer los resultados del RFLP del ITS de las distintas especies, se realizó la clonación y posteriormente la secuenciación del DNA de ésta región en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Los ITS de parásitos aislados de pacientes, representativos de cada uno de los cuadros clínicos, así como el ITS de las especies de referencia del complejo *L. mexicana*, se amplificaron mediante PCR. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. El DNA del ITS se extrajo del gel con un kit de extracción (gene clean, GIBCO BRL), y posteriormente se realizó una ligación en el vector pCR 2.1 (kit original TA cloning, Invitrogen). Para la ligación se incubaron 5 µl del inserto con 1µl del plásmido en presencia del amortiguador a 16°C durante toda la noche. Una vez completada la ligación se procedió a la transformación en células competentes *E. coli* DHα5, agregándoles el volumen total de la reacción de ligación y dejándolas durante 30 min en hielo. Luego las células se sometieron a 42°C durante 40 seg, se colocaron de inmediato en hielo y se agregó medio LB sin ampicilina. Se mezclaron por inversión y se dejaron en reposo durante 3 min, después se incubaron a 37°C durante 30 min en agitación constante, y se concentraron por centrifugación a 12,000 X g durante 40 seg. El botón celular se resuspendió en 20 µl de medio LB. Las bacterias transformadas se

sembraron y cultivaron toda la noche a 37°C en medio sólido LB (extracto de levadura 1%, bacto triptona 2%, NaCl 1%, pH 7.5), con 1.5 % de agar-agar y ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, + XGal 2% + IPTG 20%. La selección de las transformantes con inserto se hizo por color. Aquellas bacterias que incorporaron el plásmido con inserto se identificaron como colonias blancas, en contraste con aquellas que recibieron el plásmido sin inserto que resultaron colonias azules. Las colonias blancas se sembraron en parche en medio LB sólido, y las cajas se incubaron toda la noche a 37°C. El DNA del parche se extrajo con la técnica del miniprep. El DNA obtenido se digirió toda la noche a 37°C con 5 unidades de *Hind* III y *Xho* I (GIBCO BRL), y se corrió una electroforesis en agarosa al 1.5% para determinar la presencia del inserto. Una vez que se comprobó que la ligación era correcta, se aisló la colonia con el fragmento deseado y se sembró en estría cruzada, se picó una colonia aislada, se sembró nuevamente en LB líquido, y se incubó toda la noche a 37°C (117). El DNA se extrajo por columna con un kit de extracción (concert nucleic acid purification system, GIBCO BRL).

El DNA purificado de esta manera se secuenció en un equipo ABI-CE1 Mod. 310.

La similitud de las secuencias fue comparada usando el software FASTA (118) y el alineamiento múltiple se realizó con el programa ALIGN (119). Se construyeron filogramas usando el análisis neighbor-joining de 51 secuencias del ITS usando la versión 2.2 del software MEGA 2 (120).

VI) RESULTADOS

Se aislaron parásitos de pacientes con las distintas formas clínicas de las leishmaniasis cutáneas que existen en México (diseminada, localizada y pseudodifusa). Los parásitos, fueron tipificados mediante anticuerpos monoclonales y adicionalmente enviados para su tipificación al CIDEIM. Se asignó un código para su manejo internacional. Todos los parásitos aislados de pacientes con las distintas formas clínicas de leishmaniasis cutánea incluidos en este estudio pertenecen a *L. mexicana mexicana* (tabla 4).

Tabla 4.- Aislados de pacientes mexicanos de *L. mexicana mexicana* con las distintas formas clínicas de leishmaniasis cutánea (LCL. Leishmaniasis cutánea localizada; LCD. Leishmaniasis cutánea diseminada; LCPD. Leishmaniasis cutánea pseudodifusa).

AISSADOS <i>L. m. mexicana</i>	CUADRO CLÍNICO	ÁREA GEOGRÁFICA	*CÓDIGO INTERNACIONAL
1 JS	LCL	TABASCO	MHOM/MX/88/HRC JS
2 68	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/92/UADY 68
3 527	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/92/UADY 527
4 RHA	LCL	TABASCO	MHOM/MX/93/INDRE RHA
5 CV	LCL	QUINTANA- ROO	MHOM/MX/83/UADY CV
6 RMH	LCL	CHIAPAS	MHOM/MX/93/INDRE RMH
7 MC	LCL	TABASCO	MHOM/MX/88/HRC MC
8 CTC	LCL	QUINTANA- ROO	MHOM/MX/94/INDRE CTC
9 RR	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/98/UNAM RR
10 GBB	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/98/UAC GBB
11 250	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/93/UADY 250
12 815	LCL	CAMPECHE	MHOM/MX/96/UADY 815
13 GS	LCD	TABASCO	MHOM/MX/84/SET GS
14 AM	LCD	VERACRUZ	MHOM/MX/92/INDRE AM
15 AG	LCD	VERACRUZ	MHOM/MX/92/INDRE AG
16 HF	LCD	VERACRUZ	MHOM/MX/85/ISET HF
17 FD	LCD	TABASCO	MHOM/MX/93/INDRE FD
18 AMC	LCPD	TABASCO	MHOM/MX/94/INDRE AMC
19 CGM	LCPD	TABASCO	MHOM/MX/94/INDRE CGM
20 NBO	LCPD	TABASCO	MHOM/MX/94/INDRE NBO
21 JV	LCPD	TABASCO	MHOM/MX/94/INDRE JV
22 RC	LCPD	TABASCO	MHOM/MX/94/INDRE RC
23 MC 94	LCPD	TABASCO	MHOM/MX/94/INDRE MC
24 NAY8	LCL	NAYARIT	MHOM/MX/96/INDRE NAY8

* Hospedero/lugar de aislamiento/año de aislamiento/clave

En la digestión del kDNA con las distintas enzimas de restricción de los parásitos analizados, se encontró lo siguiente: en la figura 18 A se muestra el patrón de restricción (RFLP) del kDNA de once aislados representativos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea diseminada y leishmaniasis cutánea pseudodifusa, obtenido de la digestión con *Hae* III. En esta figura se clasifican los fragmentos de restricción obtenidos en 6 grupos. La digestión con *Hae* III de los aislados pertenecientes al grupo I (pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea diseminada) mostraron cuatro bandas (carriles 2-4). Los aislados del grupo II (pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea diseminada) mostraron dos bandas (carriles 5-7), aislados del grupo III (pacientes con leishmaniasis cutánea localizada) presentaron doce bandas (carril 8), aislados del grupo IV (pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa) mostraron ocho bandas (carriles 9 y 10), aislados del grupo V (pacientes con leishmaniasis cutánea localizada) mostraron tres bandas (carril 11), y aislados del grupo VI (pacientes con leishmaniasis cutánea localizada) mostraron dos bandas (carril 12). La digestión de los mismos once aislados de *L. mexicana mexicana* con *Hpa* II (figura 18 B) y *Mse* I (figura 19) confirmaron la existencia de los mismos seis grupos. Con *Hpa* II, el grupo I presentó dos bandas intensas y el grupo II (carriles 5-7) mostró dos bandas al igual que el grupo I, sin embargo la banda inferior en el grupo II fué menos intensa a su equivalente en el grupo I. El patrón de restricción del grupo III (carril 8) presentó siete bandas, el grupo IV (carriles 9 y 10) reveló cinco bandas, el grupo V (carril 11) mostró cuatro bandas y el grupo VI (carril 12) dos bandas.

Las enzimas que también permitieron diferenciar en grupos, aunque no idénticos a los seis grupos obtenidos con *Hae* III, *Hpa* II y *Mse* I, fueron *Alu* I (figura 20), *Rsa* I (figura 21) y *Dra* I (datos no mostrados). La digestión con *Alu* I permitió clasificar a los aislados en cinco grupos diferentes entre si, mientras que la digestión con *Rsa* I únicamente permitió

la clasificación de los aislados en tres grupos distintos, y la digestión con *Dra* I permitió la clasificación de los aislados en cuatro grupos. La digestión con las enzimas *Apa* I (figura 22), *Kpn* I, y *Mbo* I (datos no mostrados) no mostró diferencias entre los aislados, ya que en todos los aislados se obtuvo una banda de 700 pb.

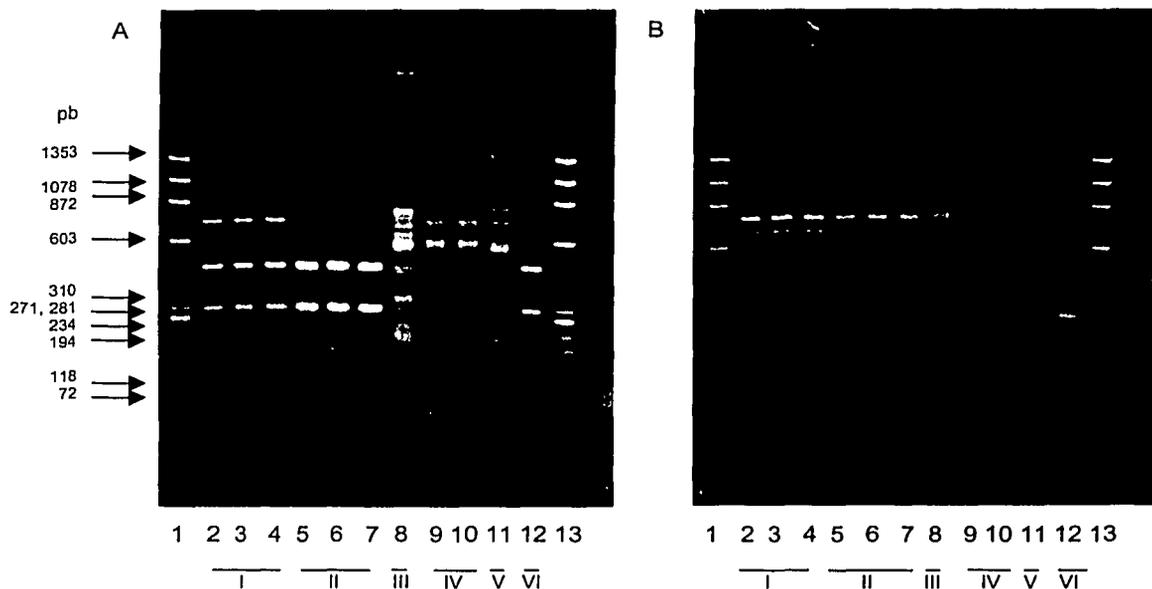


Fig. 18.- A) Digestión con *Hae* III del kDNA de 11 aislados representativos de *L. mexicana mexicana*. Carriles 1 y 13: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: aislado GS (LCD); carril 3: aislado JS (LCL); carril 4: aislado 68 (LCL); carril 5: aislado FD (LCD); carril 6: aislado MC (LCL); carril 7: aislado CTC (LCL); carril 8: aislado RR (LCL); carril 9: aislado AMC (LCPD); carril 10: aislado CGM (LCPD); carril 11: aislado 250 (LCL); carril 12: aislado 815 (LCL).
 Grupo I: carriles 2 (LCD), 3 (LCL), 4 (LCL). Grupo II: carriles 5 (LCD), 6 (LCL), 7 (LCL). Grupo III: carril 8 (LCL). Grupo IV: carriles 9 (LCPD), 10 (LCPD). Grupo V: carril 11(LCL). Grupo VI: carril 12 (LCL).

B) Digestión con *Hpa* II de los mismos aislados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

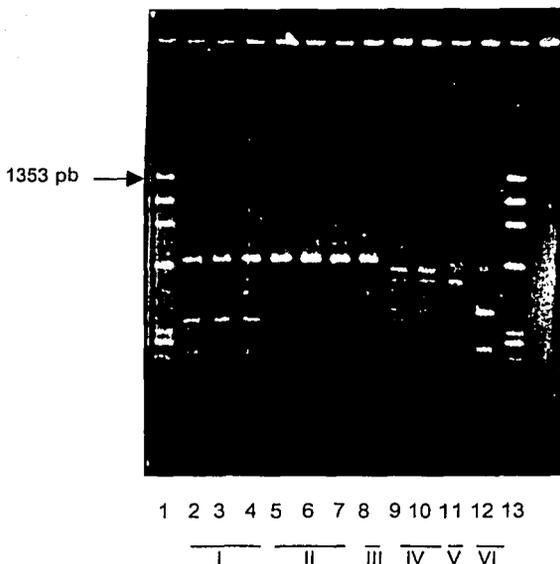


Fig. 19.- Digestión con *Mse* I del kDNA de 11 aislados representativos de *L. mexicana mexicana*. Carriles 1 y 13: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: aislado GS (LCD); carril 3: aislado JS (LCL); carril 4: aislado 68 (LCL); carril 5: aislado FD (LCD); carril 6: aislado MC (LCL); carril 7: aislado CTC (LCL); carril 8: aislado RR (LCL); carril 9: aislado AMC (LCPD); carril 10: aislado CGM (LCPD); carril 11: aislado 250 (LCL); carril 12: aislado 815 (LCL). Grupo I: carriles 2 (LCD), 3 (LCL), 4 (LCL). Grupo II: carriles 5 (LCD), 6 (LCL), 7 (LCL). Grupo III: carril 8 (LCL). Grupo IV: carriles 9 (LCPD), 10 (LCPD). Grupo V: carril 11 (LCL). Grupo VI: carril 12 (LCL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

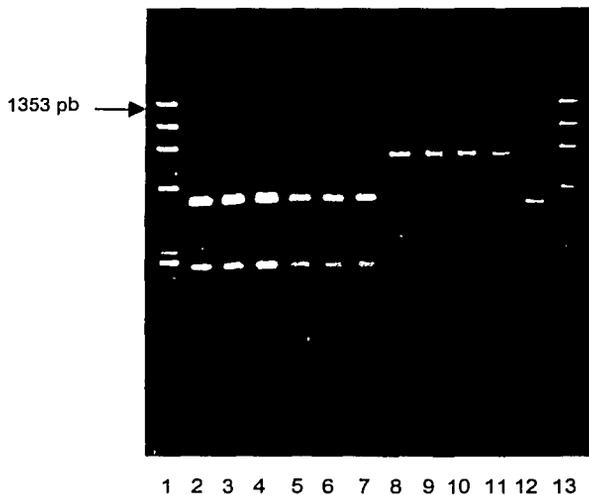


Fig. 20.- Digestión con *Alu* I del kDNA de 11 aislados representativos de *L. mexicana mexicana*. Carriles 1 y 13, marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: aislado GS (LCD); carril 3: aislado JS (LCL); carril 4: aislado 68 (LCL); carril 5: aislado FD (LCD); carril 6: aislado MC (LCL); carril 7: aislado CTC (LCL); carril 8: aislado RR (LCL); carril 9: aislado AMC (LCPD); carril 10: aislado CGM (LCPD); carril 11: aislado 250 (LCL); carril 12: aislado 815 (LCL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

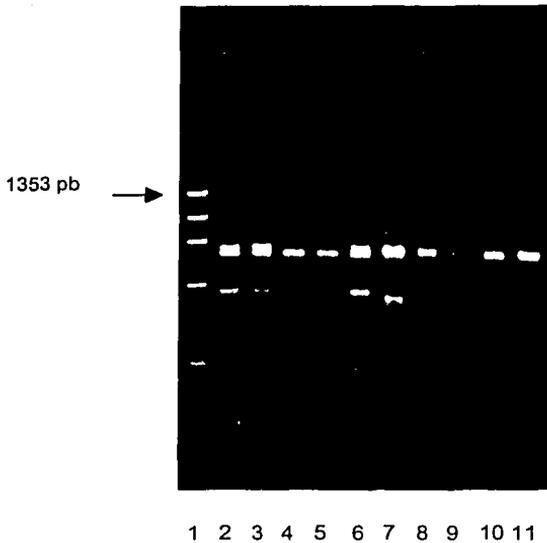


Fig. 21.- Digestión con *Rsa* I del kDNA de 10 aislados representativos de *L. mexicana mexicana*. Carril 1: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: aislado GS (LCD); carril 3: aislado JS (LCL); carril 4: aislado FD (LCD); carril 5: aislado MC (LCL); carril 6: aislado 68 (LCL); carril 7: aislado RR (LCL); carril 8: aislado CGM (LCPD); carril 9: aislado MOD (LCPD); carril 10: aislado 250 (LCL); carril 11: aislado 815 (LCL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

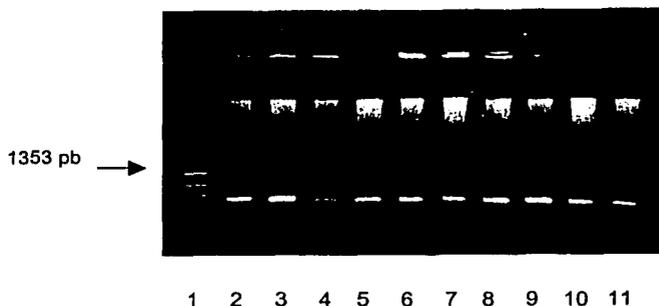


Fig. 22.- Digestión con *Apa* I del kDNA de 10 aislados representativos de *L. mexicana mexicana*. Carril 1: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); Carril 2: aislado GS (LCD); carril 3: aislado JS (LCL); carril 4: aislado FD (LCD); carril 5: aislado MC (LCL); carril 6: aislado CTC (LCL); carril 7: aislado RR (LCL); carril 8: aislado AMC (LCPD); carril 9: aislado CGM (LCPD); carril 10: aislado 250 (LCL); carril 11: aislado 815 (LCL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En resumen, el análisis del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del kDNA de 23 aislados mexicanos (tabla 4), con las enzimas *Hae* III, *Hpa* II y *Mse* I, reveló que los fragmentos de restricción se podían clasificar en seis grupos (tabla 5).

Encontramos que las leishmanias aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada pertenecían a los grupos I, II, III, V, ó VI mientras que los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada pertenecían al grupo I ó II. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se tuvo una clara distribución geográfica que se correlacionara con el patrón de restricción. Llama la atención que los seis aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa siempre mostraron un único patrón de restricción característico (grupo IV). Todos los aislados de esta forma clínica fueron obtenidos de una misma región geográfica de aproximadamente 500 km² del estado de Tabasco conocido como la Chontalpa. En este caso en particular se estableció una clara correlación entre la

especie (*Leishmania mexicana mexicana*), el patrón de restricción, localización geográfica y cuadro clínico.

Tabla 5.- Clasificación por grupos de los aislados de *L. m. mexicana* en base a los fragmentos de restricción obtenidos de la digestión del kDNA con *Hae* III, *Hpa* II y *Mse* I.

Grupos	Aislados de la Tabla 4	Total
I	1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16	10
II	7, 8, 17	3
III	9, 10	2
IV	18, 19, 20, 21, 22, 23	6
V	11	1
VI	12	1

La digestión del kDNA de las clonas de los aislados MHOM/MX/94/INDRE CGM (leishmaniasis cutánea pseudodifusa) y MHOM/MX/98/UNAM RR (leishmaniasis cutánea localizada) con *Hae* III y *Hpa* II presentaron patrones de restricción idénticos a los aislados originales de los cuales fueron clonadas (datos no mostrados). También los parásitos aislados con tres años de diferencia de un mismo paciente con leishmaniasis cutánea diseminada presentaron el mismo patrón de restricción con *Dra* I y *Hae* III (datos no mostrados).

Los patrones de restricción de los aislados mexicanos de *Leishmania mexicana mexicana* difirieron totalmente de los patrones de restricción de las especies de referencia de la OMS del complejo *L. mexicana* (*L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana venezuelensis*, y *L. mexicana pifanoi*) (figura 23). El análisis del RFLP de las

cuatro especies de referencia del complejo *L. mexicana* digeridas con *Hpa* II se muestran en la figura 23 A. *L. mexicana mexicana* M379 mostró dos bandas (carril 2), *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 mostró dos bandas de diferente tamaño molecular a *L. mexicana mexicana* M379 (carril 3), *L. mexicana pifanoi* mostró cinco bandas, y *L. mexicana amazonensis* PH8 mostró dos bandas totalmente diferentes de las otras especies. Así mismo, la digestión con *Hae* III (figura 23 B), *Alu* I (figura 23 C), y *Rsa* I (figura 23 D) de las especies de referencia de la OMS mostró diferente patrón de restricción para cada especie.

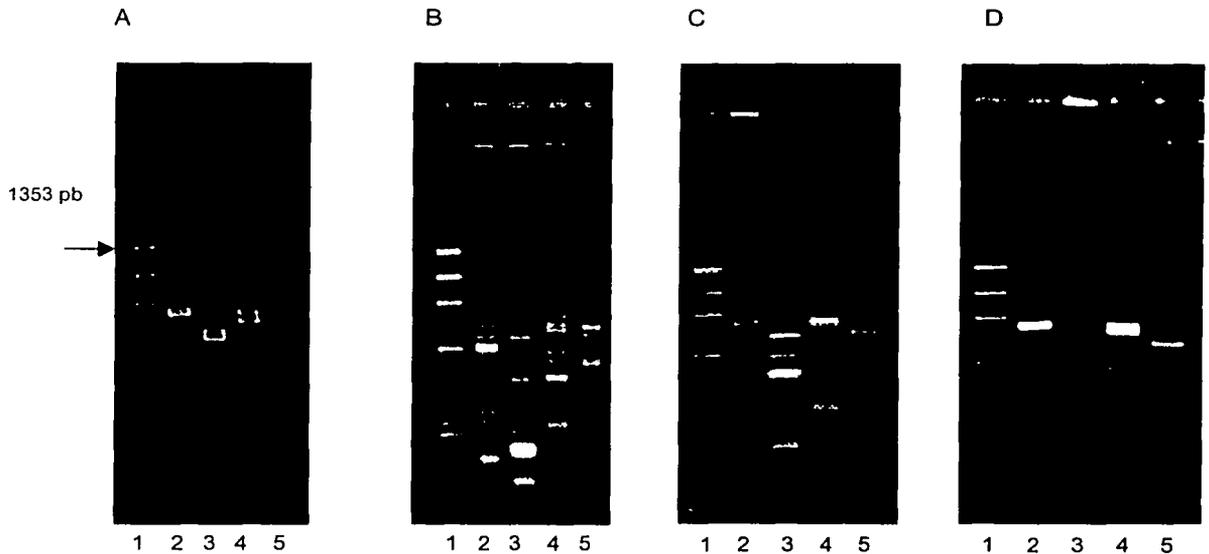


Fig. 23.- A) Digestión con *Hpa* II del kDNA de especies de referencia de la OMS pertenecientes al complejo *L. mexicana*. Carril 1: marcador de tamaño molecular(ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: *L. m. mexicana* M379; carril 3: *L. m. venezuelensis* PM-H3; carril 4: *L. m. pifanoi*; carril 5: *L. m. amazonensis* PH8.
 B) Digestión con *Hae* III de las mismas especies.
 C) Digestión con *Alu* I de las mismas especies.
 D) Digestión con *Rsa* I de las mismas especies.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Todos los patrones de restricción encontrados en parásitos aislados de pacientes mexicanos fueron diferentes a la especie de referencia de *Leishmania mexicana mexicana*, aislada de un insecto en Brasil, y de las otras especies del complejo *L. mexicana* (*Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania mexicana venezuelensis* y *Leishmania mexicana pifanoi*).

Otro de los parámetros analizado fue la cinética de crecimiento comparativa de los parásitos aislados de pacientes con los distintos cuadros clínicos (figura 24). Este análisis mostró que a las 96 h de cultivo *in vitro* los aislados de los grupos I y II (clasificados por RFLP del kDNA) crecieron dos veces más rápido que los aislados de los grupos III, IV y VI, y cerca de un 25% más que el grupo V. Mientras los aislados de leishmaniasis cutánea localizada presentaron ambas categorías de crecimiento, los aislados de leishmaniasis cutánea diseminada tuvieron un patrón de crecimiento rápido en contraste con los aislados de leishmaniasis cutánea pseudodifusa que presentaron un patrón de crecimiento lento. El análisis estadístico de la cinética de crecimiento, se realizó mediante la t de Student encontrando una diferencia significativa entre los grupos I y IV con una $t=7.58367$ y $P < 0.00063$.

NÚMERO DE PARÁSITOS A LAS 96 HORAS

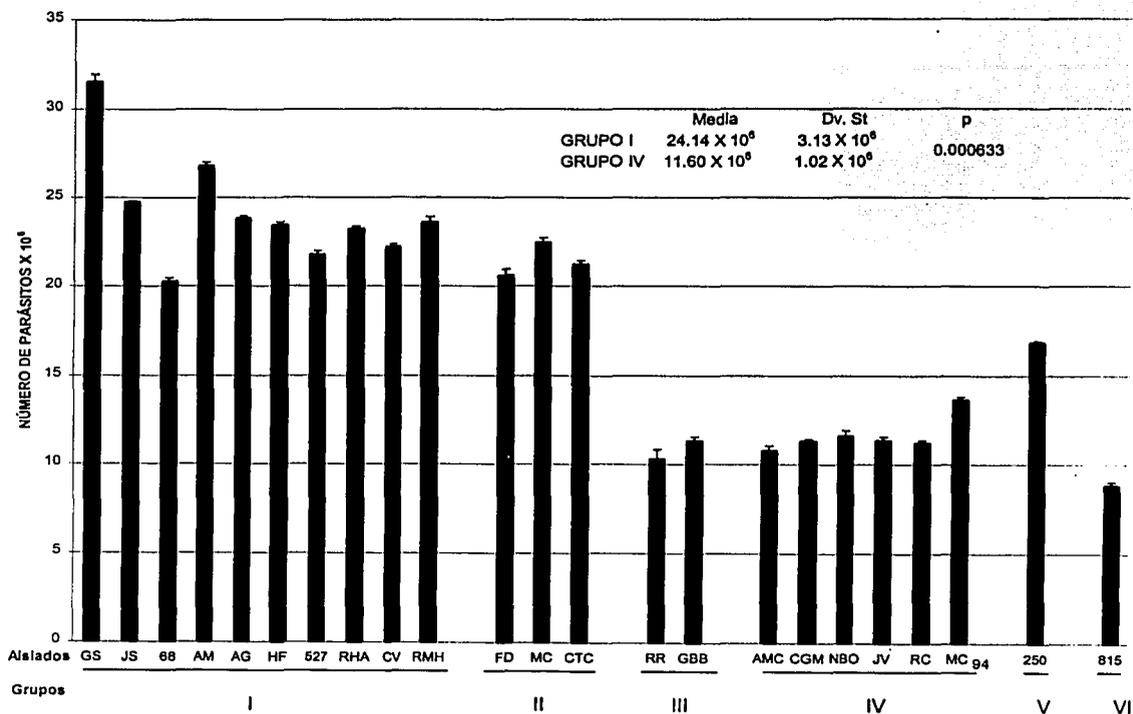


Fig. 24.- Cinética de crecimiento de parásitos a las 96 horas de cultivo *in vitro*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Debido a que el polimorfismo encontrado en el kDNA se correlacionó con uno de los cuadros clínicos se decidió buscar marcadores genéticos adicionales.

Una de las regiones tradicionalmente estudiadas para el análisis del polimorfismo genético intra- e inter- especie es el ITS, sin embargo, hasta la fecha no se había estudiado la región del ITS en especies del complejo *Leishmania mexicana*, por lo cual era de interés analizarla en nuestros aislados, así como en especies de referencia de *L. mexicana*. Por esta razón analizamos el nivel de polimorfismo del ITS y del 18S del gene rRNA.

Amplificamos por PCR las dos regiones de interés del gene rRNA: el ITS y el 18S de las especies de referencia del complejo *L. mexicana* (*L. mexicana mexicana* M379; *L. mexicana amazonensis* PH8; *L. mexicana venezuelensis* PM-H3), y de 24 aislados mexicanos de *L. mexicana mexicana* (tabla 4). Los productos de PCR fueron digeridos con distintas enzimas de restricción. Para el análisis de la región del ITS, digerimos las muestras amplificadas por PCR con *Alu* I, *Cfo* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Mbo* I, *Rsa* I y *Tha* I. Con las enzimas *Cfo* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hpa* II, y *Tha* I encontramos que la especie de referencia de *L. mexicana amazonensis* PH8 presentó un patrón de restricción diferente a las otras especies de referencia (*L. mexicana mexicana* M379 y *L. mexicana venezuelensis* PM-H3), así como con respecto a los aislados mexicanos. *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 también mostró polimorfismo con respecto a las otras especies de referencia y a los aislados mexicanos en las digestiones con *Cfo* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Mbo* I, y *Tha* I. *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 no tiene sitios de restricción para las enzimas *Hpa* II y *Rsa* I. En la digestión con *Cfo* I y *EcoR* I (figura 25 A y B), la especie de referencia *L. mexicana amazonensis* PH8 en el carril 2, y la especie de referencia *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 en el carril 3 son polimórficas con respecto a la otra especie de referencia *L. mexicana mexicana* M379 (carril 4), así como con los aislados

mexicanos (carriles 5-14). No se encontraron diferencias en el ITS entre la especie de referencia *L. mexicana mexicana* M379 del carril 4 y los aislados mexicanos.

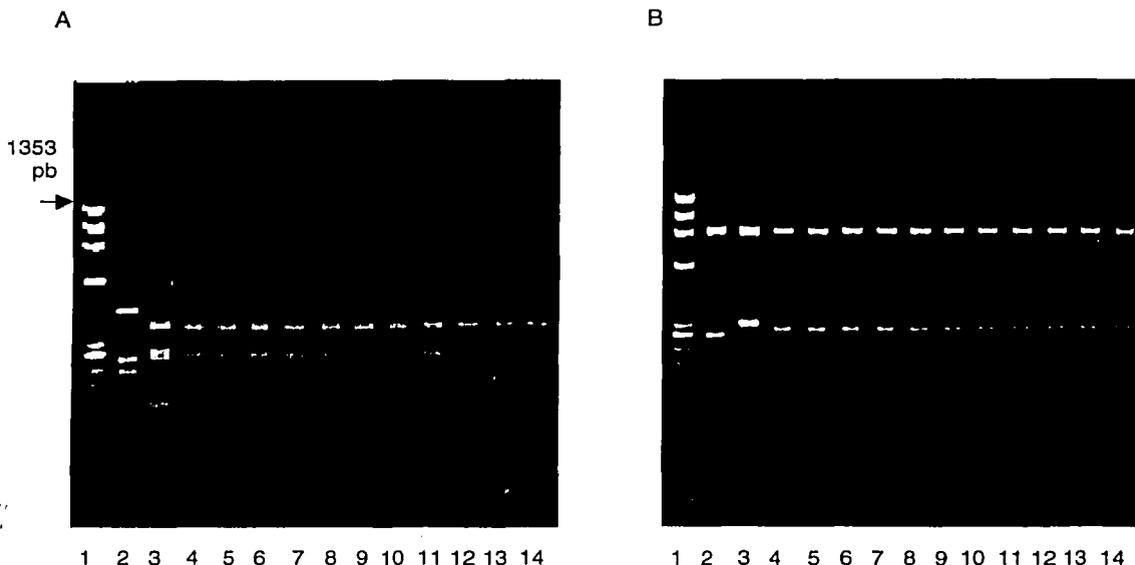


Fig. 25.- Digestión de la región del ITS. A) *Cfo* I. Carril 1: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: *L. mexicana amazonensis* PH8; carril 3: *L. mexicana venezuelensis* PM-H3; carril 4: *L. mexicana mexicana* M379; carril 5: aislado JS (LCL); carril 6: aislado AG (LCD); carril 7: aislado AM (LCD); carril 8: aislado MC (LCL); carril 9: aislado AMC (LCPD); carril 10: aislado 815 (LCL); carril 11: aislado 250 (LCL); carril 12: aislado CTC (LCL); carril 13: aislado NAY8 (LCL); carril 14: aislado RMH (LCL). B) Digestión con *Eco*R I.

Para confirmar los hallazgos encontrados con las endonucleasas de restricción, se secuenció la región del ITS en tres aislados mexicanos representativos de cada uno de los cuadros clínicos y en las tres especies de referencia. Se secuenció la región del ITS de un aislado representativo de cada cuadro clínico (leishmaniasis cutánea diseminada: GS, leishmaniasis cutánea localizada: RR y leishmaniasis cutánea pseudodifusa: NBO) y de las especies de referencia *L. mexicana mexicana* M379, *L. mexicana amazonensis* PH8, y *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 en el vector pCR 2.1. Las secuencias se enviaron a GenBank y los números de acceso son: AF466380, AF466382, AF466381,

AF466383, AF339753 y AF339752, respectivamente. Al analizar estas secuencias encontramos 100% de similitud entre GS (*leishmaniasis cutánea diseminada*) y RR (*leishmaniasis cutánea localizada*). NBO (*leishmaniasis cutánea pseudodifusa*) presentó 99.8 % de similitud con respecto a los otros aislados. En cambio el porcentaje de similitud entre *L. mexicana mexicana* M379 y *L. mexicana amazonensis* PH8 fue de 94.3%, y entre *L. mexicana mexicana* y *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 fue de 81.3%. Los porcentajes de similitud entre los aislados mexicanos y las especies de referencia se indican en la tabla 6.

Tabla 6.- Porcentajes de similitud entre las secuencias del ITS reportadas en este estudio de los parásitos analizados.

	PH8 <i>L. mexicana amazonensis</i>	PM-H3 <i>L. mexicana venezuelensis</i>	M379 <i>L. mexicana mexicana</i>	GS (LCD) <i>L. mexicana mexicana</i>	NBO (LCL) <i>L. mexicana mexicana</i>	RR (LCL) <i>L. mexicana mexicana</i>
PH8	100%	80.6%	94.3%	94.3%	94.2%	94.3%
PM-H3		100%	81.3%	81.5%	81.4%	81.5%
M379			100%	99.8%	99.6%	99.8%
GS				100%	99.8%	100%
NBO					100%	99.8%
RR						100%

Para validar los resultados obtenidos de los RFLPs de la región del ITS, comparamos los tamaños de los fragmentos que teóricamente deberíamos haber obtenido con las endonucleasas *Alu I*, *Cfo I*, *EcoR I*, *Hae III*, *Hpa II*, *Mbo I*, *Rsa I* y *Tha I* según las secuencias de la región del ITS (tabla 7) con los fragmentos obtenidos experimentalmente (RFLP) de los aislados mexicanos y de las especies de referencia del complejo *L.*

mexicana. Encontramos concordancia total en nuestros resultados obtenidos por ambas técnicas.

Tabla 7.- Análisis comparativo de los sitios de restricción presentes en las secuencias del ITS en algunos aislados mexicanos y en las especies del complejo *L. mexicana*.

ENZIMA	TAMANO DE LOS FRAGMENTOS pb <i>L. m. mexicana</i> RR, GS M379	TAMANO DE LOS FRAGMENTOS pb NBO <i>L. m. mexicana</i>	TAMANO DE LOS FRAGMENTOS pb <i>L.m.</i> <i>amazonensis</i> PH8	TAMANO DE LOS FRAGMENTOS. pb <i>L. m.</i> <i>venezuelensis</i> PM-H3	SECUENCIA QUE RECONOCE
<i>Alu</i> I	3 726, 391, 19.	3 728, 391, 19.	3 720, 385, 22.	3 727, 393, 22.	ag/ct
<i>Cfo</i> I	6 353, 255, 215, 129, 97, 87.	6 353, 257, 215, 129, 97, 87.	6 428, 251, 214, 97, 85, 52.	5 367, 270, 241, 134, 130.	gcg/c
<i>EcoR</i> I	2 848, 288.	2 850, 288.	2 856, 271.	2 843, 299.	g/aattc
<i>Hae</i> III	5 624, 270, 88, 78, 76.	5 626, 270, 88, 78, 76.	4 637, 255, 164, 71.	3 707, 281, 154.	gg/cc
<i>Hpa</i> II	2 818, 318.	2 820, 318.	2 826, 301.	NO CORTA	c/cgg
<i>Mbo</i> I	3 968, 146, 22.	3 970, 146, 22.	3 961, 141, 25.	3 986, 131, 25.	/gatc
<i>Rsa</i> I	2 1005, 131.	2 1007, 131.	2 998, 129.	NO CORTA	gt/ac
<i>Tha</i> I	5 361, 276, 206, 192, 101.	5 363, 276, 206, 192, 101.	5 426, 357, 190, 100, 54.	9 319, 270, 155, 137, 132, 64, 28, 28, 9.	cg/cg

Las secuencias del ITS obtenidas de los aislados mexicanos GS, RR, NBO, y de las especies de referencia *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis* y *L. mexicana venezuelensis* fueron alineadas con todas las secuencias del espaciador transcrito interno de *Leishmania* existentes en el GenBank. Cuando realizamos el análisis con el programa FASTA encontramos que la secuencia de la región del ITS de *L. mexicana venezuelensis* tiene 99.2, 99.27, 94.79 y 94.64% de similitud con las secuencias de la misma región reportada para las especies de *L. major* : Friedlin, NLB089A, Vin y ASKH (localizadas en Medio Oriente), respectivamente (tabla 8).

En un filograma generado con el programa MEGA 2 se encontró que la secuencia del ITS de *L. mexicana venezuelensis* PM-H3, se agrupa con las secuencias de *L. major* (figura 26).

Tabla 8.- Porcentajes de similitud de la secuencia del ITS de *L. mexicana venezuelensis* PM-H3, en comparación a secuencias en GenBank de aislados de *L. major*.

	<i>L. major</i> , FRIEDLIN	<i>L. major</i> , VIN	<i>L. major</i> , ASKH	<i>L. major</i> , NLB089A
<i>L. mexicana venezuelensis</i> , PM-H3	99.214%	94.789%	94.136%	99.269%

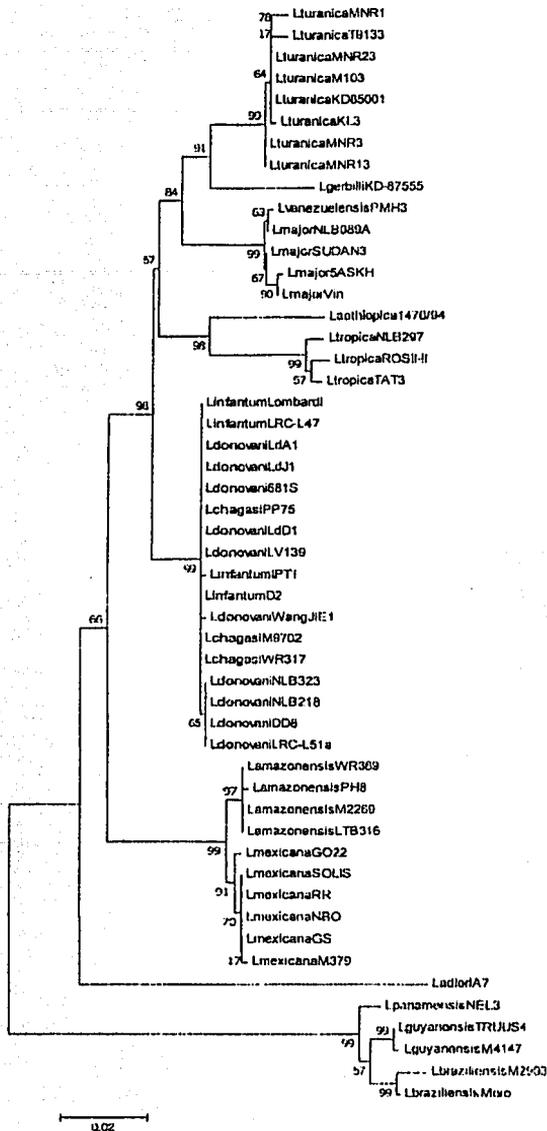


Fig. 26.- Figiograma de 51 secuencias del ITS de *Leishmania*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La similitud de las secuencias de *L. major* y *L. mexicana venezuelensis* se confirmó mediante RFLP del ITS con las endonucleasas de restricción: *Alu* I, *Cfo* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Mbo* I, *Rsa* I y *Tha* I. En la digestión del ITS con *EcoR* I y *Cfo* I de tres especies de referencia del complejo *L. mexicana*, de un aislado mexicano (GS) y de *L. major* (figura 27 A y B respectivamente), se encontró que *L. major* (carril 2), mostró un patrón de restricción idéntico a *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 (carril 3) y diferente de las otras especies de referencia así como del aislado mexicano (carriles 5-6). El mismo resultado se obtuvo con las otras endonucleasas utilizadas.

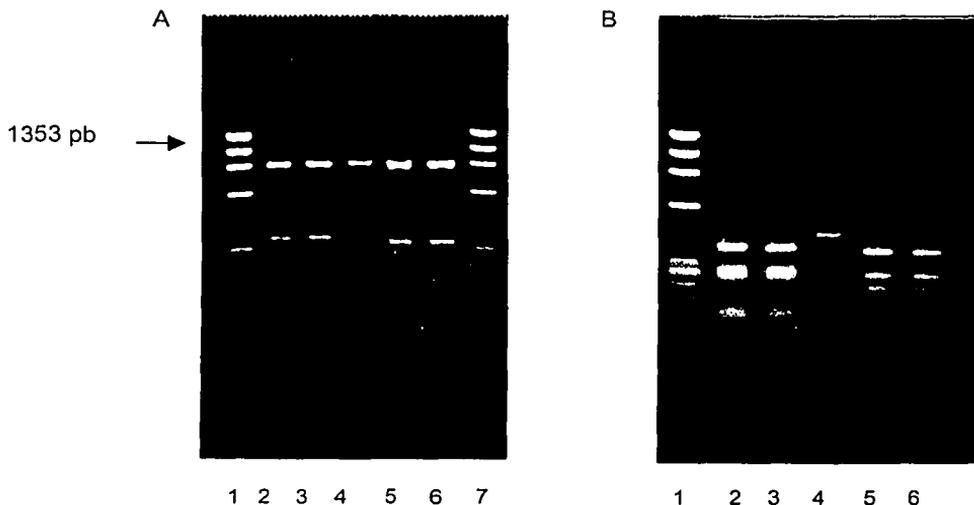


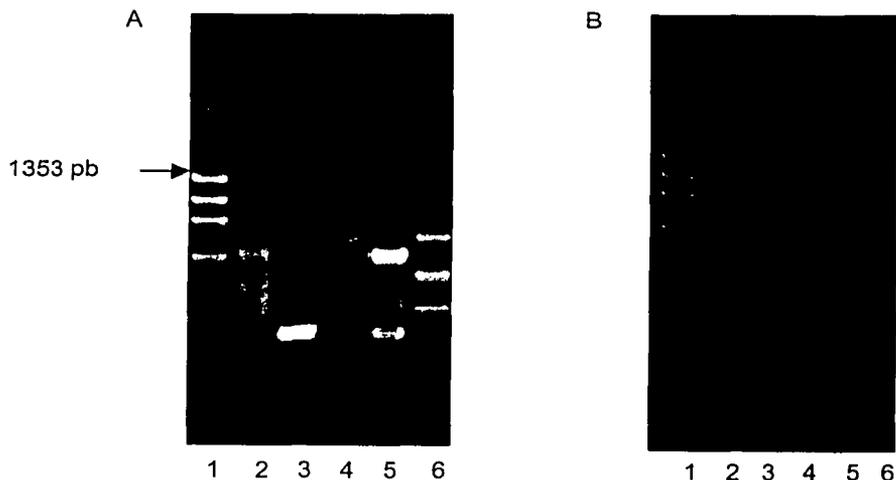
Fig. 27.- Digestión de la región del ITS. A) *EcoR* I. Carril 1: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: *L. major*, ASKH; carril 3: *L. mexicana venezuelensis* PM-H3; carril 4: *L. mexicana amazonensis* PH8; carril 5: *L. mexicana mexicana* M379; carril 6: aislado GS (LCD). B) Digestión con *Cfo* I de las mismas especies.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para descartar la posibilidad de un error en nuestro cepario (cultivamos la especie *L. major* ASKH), solicitamos nuevamente a la Dra. Nancy Saravia el envío de *L. mexicana venezuelensis* PM-H3. Dicha especie fue analizada mediante RFLP de la región del ITS, encontrando nuevamente que ambas especies presentan el mismo patrón de restricción con las endonucleasas utilizadas.

Otra manera de demostrar que no se trataba de la misma especie fue realizar el análisis por RFLP del kDNA de ambas (*L. major* ASKH y *L. mexicana venezuelensis* PM-H3).

Digerimos el kDNA de ambas especies con *Hae* III y *Alu* I (figura 28 A y B). *L. major* ASKH (carril 2) y *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 (carril 3), presentaron un patrón de restricción totalmente diferente entre sí y fueron diferentes a *L. mexicana amazonensis* PH8 (carril 4) y *L. mexicana mexicana* (carriles 5 y 6)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 28.- A) Digestión con *Hae* III del kDNA de especies de referencia de la OMS pertenecientes al complejo *L. mexicana*. Carril 1: marcador de tamaño molecular(ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: *L. major* 5ASKH; carril 3: *L. m. venezuelensis* PM-H3; carril 4: *L. m. amazonensis* PH8; carril 5: *L. m. mexicana* M379; carril 6: *L. m. mexicana* GS. B) Digestión con *Alu* I de las mismas especies.

Para el 18S digerimos con *Alu* I, *Cfo* I, *Dra* I, *Hae* III, *Hinc* II, *Hpa* II, y *Tha* I. Con todas las endonucleasas utilizadas encontramos un patrón de restricción idéntico entre las tres especies de referencia así como en los 24 aislados mexicanos. En la figura 29 A y B se muestran las digestiones con *Cfo* I y *Hae* III respectivamente.

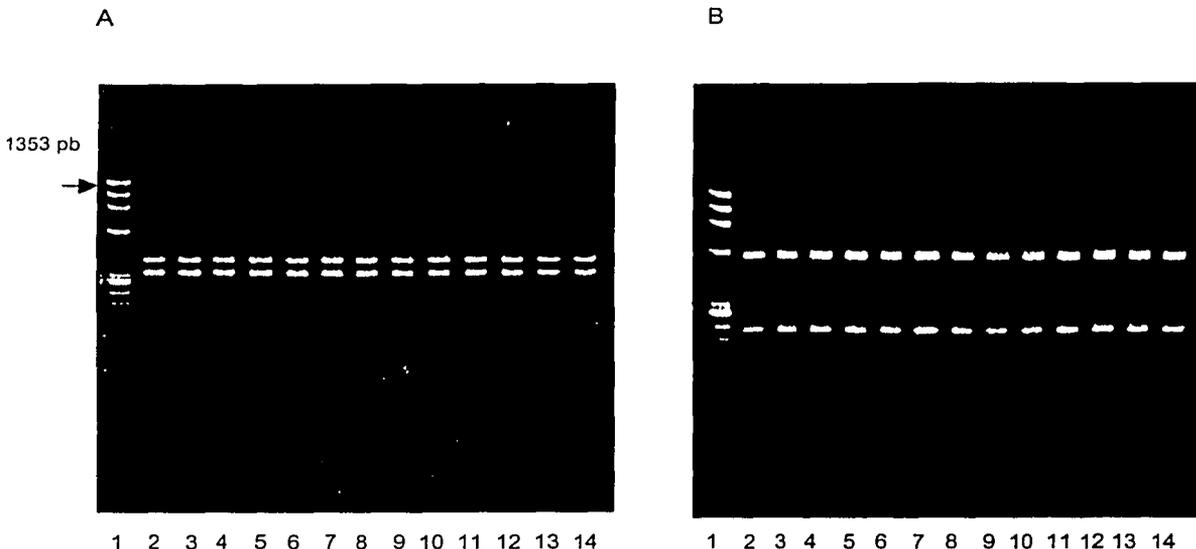


Fig. 29.- Digestión del 18S. A) *Cfo* I. Carril 1: marcador de tamaño molecular (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III); carril 2: *L. mexicana amazonensis* PH8; carril 3: *L. mexicana venezuelensis* PM-H3; carril 4: *L. mexicana mexicana* M379; carril 5: aislado JS (LCL); carril 6: aislado AG (LCD); carril 7: aislado AM (LCD); carril 8: aislado MC (LCL); carril 9: aislado AMC (LCPD); carril 10: aislado 815 (LCL); carril 11: aislado 250 (LCL); carril 12: aislado CTC (LCL); carril 13: aislado NAY8 (LCL); carril 14: aislado RMH (LCL). B) Digestión con *Hae* III de las mismas especies.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La región del 18S no fue secuenciada debido a que no se encontró polimorfismo. Sin embargo, al analizar los sitios de restricción obtenidos experimentalmente (RFLP) con los sitios de corte teóricos según la secuencia del 18S de *L. amazonensis* publicada en el

GenBank (X53912) (tabla 9), confirmamos que no existe heterogeneidad en esta región. El tamaño de los fragmentos que se deberían haber obtenido según la secuencia correspondió con los patrones de restricción de los RFLPs de esta región, obtenidos con *Alu I*, *Cfo I*, *Dra I*, *Hae III*, *Hinc II*, *Hpa II*, y *Tha I*.

Tabla 9.- Análisis de los sitios de restricción de la secuencia del 18S de *L. amazonensis*

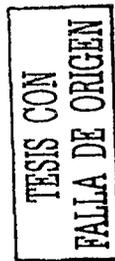
ENZIMA	TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS pb	SECUENCIA QUE RECONOCE
<i>Alu I</i>	5 190, 188, 165, 170, 87.	ag/ct
<i>Cfo I</i>	3 386, 325, 89.	gcg/c
<i>Dra I</i>	2 569, 231.	ttl/aaa
<i>Hae III</i>	3 375, 370, 55.	gg/cc
<i>Hinc II</i>	3 405, 293, 102.	gty/rac
<i>Hpa II</i>	5 376, 187, 131, 96, 10.	c/cgg
<i>Tha I</i>	3 475, 177, 148.	cg/cg

VII) DISCUSIÓN

Las leishmaniasis son endémicas en México y se manifiestan mediante un amplio espectro de enfermedades clínicas que incluyen la leishmaniasis cutánea localizada, que representa la forma clínica relativamente benigna, la leishmaniasis cutánea diseminada, que es una de las formas más severas de esta parasitosis, y la leishmaniasis cutánea pseudodifusa, que es una forma intermedia. A pesar de la variedad de formas clínicas, se conoce muy poco acerca de las especies de *Leishmania* que causan estos cuadros clínicos en México. En este trabajo, analizamos 23 aislados de leishmanias obtenidos de pacientes con las distintas formas clínicas y originarios de los estados del país donde existe una elevada incidencia de las leishmaniasis.

La tipificación mediante isoenzimas y anticuerpos monoclonales reveló que todos los aislados mexicanos pertenecen a la especie *Leishmania mexicana mexicana*, la cual puede producir cualquiera de las formas clínicas de leishmaniasis cutánea: localizada, diseminada y pseudodifusa.

Por el interés de determinar si variaciones genéticas intraespecie de aislados de *L. mexicana mexicana* se pueden correlacionar con los distintos cuadros clínicos, analizamos la heterogeneidad genética de los aislados mexicanos y de las especies de referencia del complejo *L. mexicana* mediante el análisis del RFLP del kDNA con 9 endonucleasas de restricción y realizamos una cinética de crecimiento de los aislados. Además analizamos dos regiones conservadas del gene rRNA (ITS y 18S) mediante RFLP. Encontramos heterogeneidad en los patrones de restricción del kDNA de los aislados mexicanos de *Leishmania mexicana mexicana*. El polimorfismo en el número e intensidad de las bandas permitió clasificar a los aislados mexicanos en 6 grupos. Las digestiones con *Hae* III, *Hpa* II y *Mse* I, permitieron agrupar a los aislados de leishmaniasis cutánea localizada en cinco de seis posibles grupos (I, II, III, V, ó VI), mientras que los aislados de leishmaniasis cutánea diseminada pueden pertenecer a dos



grupos (I ó II). Todos los aislados de leishmaniasis cutánea pseudodifusa pertenecen al mismo grupo (IV). El resultado más notable fue la evidencia en el análisis del kDNA de aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa que reveló una divergencia genética que se correlaciona con el cuadro clínico y región geográfica.

El análisis de la cinética de crecimiento de los aislados mexicanos, permitió su diferenciación en aislados de crecimiento rápido y crecimiento lento. Todos los aislados de los grupos I y II, presentaron un patrón de crecimiento rápido a diferencia de los grupos III, IV, y VI, que tienen como característica un patrón de crecimiento lento. El grupo V tiene un patrón de crecimiento intermedio. Interesantemente, mientras los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada pueden pertenecer a ambas categorías de crecimiento, los aislados de leishmaniasis cutánea diseminada pertenecen al patrón de crecimiento rápido, y los aislados de leishmaniasis cutánea pseudodifusa tienen un patrón de crecimiento lento.

Debido a que todos los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa únicamente presentaron un solo patrón de restricción del kDNA que se puede correlacionar con el cuadro clínico, con la cinética de crecimiento, y con la zona geográfica, sugiere que el kDNA pudiera ser utilizado como marcador de virulencia. La caracterización del kDNA de aislados de la misma especie, que pueden producir diferentes cuadros clínicos de la enfermedad, puede ser utilizada para detectar pacientes que requieren tratamiento intensivo y vigilancia médica especial. Este estudio le adjudica un nuevo significado biológico al kDNA, ya que la heterogeneidad genética parece no ser al azar sino que presenta patrones definidos. Aunque la heterogeneidad de la región variable del kDNA, la única forma de DNA mitocondrial en los Kinetoplastida ha sido utilizada para la discriminación entre diferentes especies y subespecies (78, 80-82), este es el primer estudio en que las características genotípicas del kDNA pueden ser asociadas con datos clínicos, geográficos y biológicos.

La especie de referencia de la OMS de *Leishmania mexicana mexicana* M379, aislada en Belice, presentó un patrón de restricción totalmente diferente a los aislados mexicanos, esta diferencia se puede deber a factores geográficos y del hospedero, ya que la especie de referencia *Leishmania mexicana mexicana* M379, fue aislada de un insecto, mientras que los aislados mexicanos fueron obtenidos de pacientes. Los patrones de restricción de los aislados mexicanos de *Leishmania mexicana mexicana* también difirieron de los patrones de restricción de las otras especies de referencia del complejo *Leishmania mexicana* (*Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania mexicana pifanoi* y *Leishmania mexicana venezuelensis*).

En el análisis de dos regiones del gene rRNA (ITS y 18S) de los aislados mexicanos y de las especies de referencia *Leishmania mexicana mexicana* M379, *Leishmania mexicana amazonensis* PH8 y *Leishmania mexicana venezuelensis* PM-H3 se encontró que la región del ITS amplificada por PCR y analizada mediante RFLP, mostró un patrón de restricción idéntico en todos los aislados mexicanos de *L. mexicana mexicana*, incluyendo la especie de referencia de la OMS (*L. mexicana mexicana* M379). Este patrón difirió totalmente de los patrones detectados en las otras dos especies del complejo *L. mexicana* analizadas que son: *L. mexicana amazonensis* y *L. mexicana venezuelensis*, las cuales también fueron polimórficas entre sí. Nuestros resultados muestran importantes diferencias entre las especies analizadas, similares a las encontradas entre especies del subgénero *Viannia*.

No obstante, las secuencias de los ITSs suelen ser específicas, permitiendo la diferenciación entre especies muy próximas e incluso entre especies indiferenciables por otros métodos, Cupolillo y cols encontraron que *L. (V.) naiffi* y *L.(V.) braziliensis* son altamente polimórficas en la región del ITS en contraste con aislados de *L. (V.) panamensis*, que no muestra polimorfismo en esta región (97). Así mismo, Shönian, y El Tai, reportaron que especies del complejo *L. donovani* y *L. tropica* tienen alguna

variabilidad dentro del ITS, sin embargo cuando amplifican esta región por PCR y la digieren con enzimas de restricción, no detectan polimorfismo (106, 121).

El análisis del 18S mediante la digestión con enzimas de restricción mostró ausencia de polimorfismo en esta región, lo que confirma los datos obtenidos por otros autores que reportan solo mutaciones puntuales en la misma entre diferentes especies de *Leishmanias* (113). El estudio del 18S ha sido utilizado para el análisis filogenético de géneros de la familia Trypanosomatidae (91, 93, 112, 113). El polimorfismo en la región del ITS y la ausencia de polimorfismo dentro del 18S entre las 3 especies del subgénero *Leishmania* estudiadas, es totalmente opuesto al gran polimorfismo detectado en *L. (V.) naiffi* y *L.(V.) braziliensis* del subgénero *Viannia*, pero concuerda con lo encontrado para *L.(V.) panamensis*, *L. donovani* y *L. tropica* (97).

Nuestros resultados de las secuencias de la región del ITS de tres aislados mexicanos y de las tres especies de referencia confirmaron la similitud en esta región entre los tres aislados y la especie de referencia de *L. mexicana mexicana*. Así mismo confirmaron el polimorfismo en esta región entre *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, y *L. mexicana venezuelensis*.

Realizamos alineamientos iniciales de nuestras secuencias (GS, RR, NBO, M379, PM-H3, PH8), mas cinco secuencias de la región del ITS del GenBank pertenecientes al complejo *Leishmania mexicana* (GO22, M2269, WR369, LTB316, SOLIS) y en un filograma generado con estos alineamientos se encontró que *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 se agrupa independientemente. Un resultado sorprendente fue obtenido cuando realizamos el análisis FASTA de las secuencias publicadas en GenBank de los ITS de *Leishmania* que reveló que *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 presenta 100% de similitud con la secuencia completa de la región del ITS de varios aislados de *L. major*.

Davila y Momem utilizaron 36 secuencias de la región del ITS para explorar la relación filogenética dentro *Leishmania* (108). En vista de la similitud entre las secuencias de *L.*

venezuelensis y *L. major*, fue interesante realizar el filograma propuesto por estos autores con nuestros datos y las secuencias obtenidas del GenBank. El análisis confirmó las observaciones hechas por estos autores ya que se encontró un agrupamiento de *L. infantum*, *L. chagasi* y *L. donovani*, mientras que *L. tropica* y *L. aethiopica* y *L. major* tienen agrupamientos separados, y un grupo conteniendo a *L. mexicana* y *L. amazonensis*. Interesantemente, *L. venezuelensis* aparece en el brazo de *L. major*. El que la especie de *L. major* erróneamente se haya confundido con *L. venezuelensis* o que una especie fue contaminada con la otra no fue posible en vista de los distintos patrones obtenidos mediante el análisis de restricción del kDNA de ambas especies.

L. venezuelensis siempre ha sido clasificada dentro del complejo *Leishmania mexicana*. Esta clasificación se basó en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, características de cultivo en agar sangre, reactividad con anticuerpos monoclonales y zimodemos (7). Prácticamente no existen datos del análisis de DNA de esta especie. Nuestra secuencia del ITS es la primera reportada para esta especie de *Leishmania*. Anteriormente ya se había descrito similitud entre *L. mexicana venezuelensis* y leishmanias con características *L. major-like*. En varios reportes de leishmanias, *L. major-like* en Brasil (122), Ecuador (123) y Paraguay (124) encontraron que los parásitos *L. major-like* presentan patrones de restricción similares entre sí, pero diferentes de *L. major*, mientras que en el análisis por isoenzimas *L. major-like* es indistinguible de *L. major*. Sin embargo Katamura (125) reporta que los cariotipos del DNA de parásitos *L. major-like* de Ecuador son diferentes a *L. major* del Viejo Mundo.

El alto grado de conservación de una de las regiones más variables del rDNA entre *L. venezuelensis* y *L. major*, dos parásitos con muy diferente distribución geográfica, lleva a la especulación de que quizás *L. major* fue introducida recientemente en el Nuevo Mundo. Una posibilidad es que *L. major* haya sido introducida al Nuevo Mundo por colonos europeos, esclavos africanos, o sus perros acompañantes y haya sido transmitida

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por vectores presentes en América de manera análoga a *L. infantum* del Viejo Mundo, que también puede ser transmitida por vectores del Nuevo Mundo (126, 127). También, se han demostrado casos de importación de leishmaniasis visceral canina al Nuevo Mundo (128, 129). Es claro que se necesita mas información, en todos los aspectos, pero particularmente en el análisis del DNA, para confirmar o modificar la clasificación de *L. venezuelensis* dentro del complejo *L. mexicana*.

VIII) CONCLUSIONES

- 1.- Todos los parásitos aislados de pacientes con las distintas formas clínicas de leishmaniasis cutánea incluidos en este estudio pertenecen a la especie *L. mexicana mexicana*.
- 2.- El análisis por RFLP con 3 endonucleasas (*Hae* III, *Hpa* II, *Mse* I) del kDNA de *L. mexicana mexicana* aislada de pacientes con cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea diseminada y leishmaniasis cutánea pseudodifusa revela que existe polimorfismo en los patrones de restricción que se clasificó en seis grupos.
- 3.- Los aislados de los pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada se distinguen de los aislados de los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea pseudodifusa en que únicamente presentan 2 patrones de restricción (grupos I y II) con las endonucleasas antes mencionadas, además todos los aislados de estos pacientes presentan un mismo patrón de crecimiento rápido.
- 4.- Los aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea pseudodifusa se distinguen del resto de los aislados, en que todos provienen de una zona geográfica, pertenecen a un solo patrón de restricción (grupo IV) y además presentan un mismo patrón de crecimiento lento.
- 5.- Los parásitos aislados en México de *L. mexicana* difieren en los patrones de restricción del kDNA de la especie de referencia de *L. mexicana mexicana* aislada en Belice.
- 6.- Tres especies del complejo *L. mexicana*: *Leishmania mexicana mexicana*, *Leishmania mexicana amazonensis* y *L. mexicana venezuelensis*, presentan polimorfismo en la región del ITS del gene rRNA, sin embargo no existe polimorfismo entre los distintos aislados de *Leishmania mexicana mexicana*.
- 7.- *L. mexicana venezuelensis* presenta una secuencia idéntica a *L. major* NLB089A y *L. major* FRIEDLIN en una región del rDNA, el ITS. Esta similitud podría reflejar que *L.*

mexicana venezuelensis es en realidad *L. major* introducida en América, lo que sugiere que la clasificación taxonómica existente de *Leishmania* y de los marcadores utilizados para definir especies debería ser re-evaluada.

8.- No existe polimorfismo en la región del 18S del gene rRNA en parásitos pertenecientes al complejo *L. mexicana*.

IX) REFERENCIAS

- 1.- Organización Mundial de la Salud. Epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis en América Latina. 1994.
- 2.- Grevelink, SA., Ethan, A., Lerner. Leishmaniasis: clinical reviews. *J Am Acad Dermatol*. 34:257-272. 1996.
- 3.- Cordova Uscanga, C., Albertos Alpuche, NE., Andrade Narvaéz, FJ., Canto Lara, SB. Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. *Sal Púb (Mex)*. Vol. 35. 4:345-350. 1993.
- 4.- Grimaldi, G Jr., Tesh, RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 6:230-250. 1993.
- 5.- Whittaker, RH. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*. 10;163(863):150-160. 1969.
- 6.- Levine, ND., Corliss, JO., Cox, FE., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, BM., Leedale, GF., Loeblich, AR 3rd., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, EG., Page, FC., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, FG. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 27(1):37-58. 1980.
- 7.- Lainson, R., Shaw, JJ. The Leishmaniasis in biology and medicine. Vol. 1. Peters W y Killick-Kendrick R (ed.). Academic Press, London. 1-120. 1987.
- 8.- Killick-Kendrick, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 78(5 Pt 2):747-755. 1985.
- 9.- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., Grimaldi, G Jr. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. *Parasitol Today*. 16(4):142-144. 2000.
- 10.- Velasco Castrejón, O. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos técnicos del INDRE. No. 7. 1994.
- 11.- Brucker, G. Las Leishmaniasis en América Latina. Rhoune- Poulenc Santé.
- 12.- Borst, P. Why kinetoplast DNA networks?. *Trends Genet*. 7(5):139-141. Review. 1991.
- 13.- Chakrabarty, R., Mukherjee, S., Lu, HG., McGwire, BS., Chang, KP., Basu, MK. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG). *J Parasitol*. 82(4):632-635. 1996.
- 14.- Handman, E., Goding, JW. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J*. 4(2):329-336. 1985.
- 15.- Russell, DG. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur J Biochem*. 164(1):213-221. 1987.
- 16.- Segovia, M. Parasitología Molecular. Col. Nuevas Tendencias, Vol. 24. Rivas L. y López MC. (ed.). CSIC, Madrid. 27-39. 1993.
- 17.- Zaman. Atlas de parasitología Médica. Ed. Panamericana. 1979.
- 18.- Herrera, A., Christensen, MA. Implication of phlebotomus sandflies as early as 1764. *Science*. 190:154-155. 1975.
- 19.- Velasco Catrejón, O. Las leishmaniasis en México. *Rev Latinoamer Microbiol*. 29:119-126. 1987.
- 20.- Veronesi. Enfermedades infecciosas y parasitarias. El Ateneo. 1971.
- 21.- Quate, LW. Phlebotomus sandflies of the paloich area in the Sudán (Dypt. Psych). *J Med Entomol*. 1:213-286. 1964.
- 22.- Jones, DE., Elloso, M., Scott, P. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Bioscience*. 3:1171-1180. 1998.

- 23.- Killick-Kendrick, R., Molyneux, DH., Ashford, RW. Leishmania in phlebotomid sandflies: 1. Modification of the flagellum associated with attachment to the midgut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc. London Series B.* 187:409-419. 1974.
- 24.- Pimenta, PF., Turco, SJ., McConville, MJ., Lawyer, PG., Perkins, PV., Sacks, DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science.* 26:256(5065):1812-1825. 1992.
- 25.- Sacks, DL., Perkins, PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 223(4643):1417-1429. 1984.
- 26.- Schlein, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today.* 9:255-257. 1993.
- 27.- Killick-Kendrick, R. *Biology of the Kinetoplastida.* Lumsden WHR y Evans DA (ed.). Academic Press, London-New York. 2:395-460. 1979.
- 28.- Noble, ER., Noble, GA., Schad, GA., MacInnes, AJ. *Parasitology: The biology of animal parasites.* 6ed. Philadelphia: Lea and Febiger. 1989.
- 29.- Kerdel-Vega, F. American leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 6:291-303. 1982.
- 30.- Beltran, E. Datos epidemiológicos acerca de la "úlceras de los chicheros" (leishmaniasis americana) en México. *Rev Inst Salubridad Enf Trop.* 3:1-19. 1942.
- 31.- Zavala-Velazquez, J. Leishmaniasis en Yucatán. *Gaceta Med Mex.* 104:1-7. 1972.
- 32.- Martinez, MR. Urna olmeca que podría representar la leishmaniasis tegumentaria diseminada. *Sal Pub (Méx).* 24:497-499. 1982.
- 33.- Zeledon, R. Leishmaniasis in North America, Central America and the Caribbean islands. En: Chang KP, Bray RS, Eds. *Human parasitic diseases: leishmaniasis.* Netherlands: Elsevier. 313-354. 1985.
- 34.- I Conferencia Interamericana para la prevención y el control de las leishmaniasis. Ciudad de México. 1994.
- 35.- Información oficial proporcionada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
- 36.- Velasco-Castrejon, O. Leishmaniasis cutánea en voluntarios humanos. *Mem Cong Mex Dermatol México.* 1970.
- 37.- Walton, B., Velasco-Castrejon, O. The distribution and aetiology of diffuse cutaneous leishmaniasis in the New World. *Proc. NATO Advances Study Institute on Leishmaniasis.* Zatkinos, Grecia. 1987.
- 38.- Velasco-Castrejon, O., Savarino, S., Walton, B., Gam, A., Neva F. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 41:280-288. 1989.
- 39.- Jones, TC., Johnson, WD., Barretto, AC., Lago, E., Badaro, R., Cerf, B., Reed, SG., Netto, EM., Tada, MS., Franca, TF. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis.* *J Infect Dis.* 156:73-83. 1987.
- 40.- Saravia, NG., Holguin, AF., McMahon-Pratt, D., D'Alessandro, A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg.* 34:714-720. 1985.
- 41.- Melby, PC., Kreutzer, RD., McMahon-Pratt, D., Gam, AA., Neva, FA. Cutaneous leishmaniasis: review of 59 cases seen at the National Institutes of Health. *Clin Infect Dis.* 15:924-937. 1992.
- 42.- Grimaldi, G., David, JR., McMahon-Pratt, D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by seroderme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 36:270-287. 1987.
- 43.- Lainson, R., Shaw, JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA, eds. *Biology of the kinetoplastida.* New York: Academic Press. 2:68-90. 1979.
- 44.- The leishmaniasis Report. WHO committee. *Thechn. Rep. Series 701.* WHO Geneve. 1984.

- 45.- Kerdel-Vegas, F. American leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 6:291-303. 1982.
- 46.- Parks, A., Camisa, C. Sporotrichoid leishmaniasis: report of a case in an American graduate student. *J Am Acad Dermatol.* 17(5 Pt 1):855-856. 1987.
- 47.- Berger, TG., Meltzer, MS., Oster, CN. Lymph node involvement in leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 12(6):993-996. 1985.
- 48.- Kubba, R., El-Hassan, AM., Al-Gindan, Y., Omer, AH., Kutty, MK., Saeed, MB. Dissemination in cutaneous leishmaniasis. I. Subcutaneous nodules. *Int J Dermatol.* 5:300-304. 1987.
- 49.- Gaafar, A., Fadl, A., El Kadaro, AY., El Hassan, MM., Kemp, M., Ismail, AI., Morgos, SA., El Hassan, AM. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* of different zymodesmes in the Sudan and Saudi Arabia: a comparative study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 5:552-554. 1994.
- 50.- Aal-Shammari, SA., Khoja, TA., Fehr, A. Cutaneous leishmaniasis in Riyadh region: four-year study of the epidemiologic and clinical features. *Int J Dermatol.* 8:565-567. 1992.
- 51.- Velasco-Castrejon, O., Rivas-Sánchez, B., García, M., Lázaro, GJ., Hobart, O., Roldán, S., Munguía, A. Leishmaniasis cutánea pseudodifusa, una nueva forma clínica de leishmaniasis cutánea en México. XXII Congreso anual de la asociación mexicana de infectología y microbiología clínica. IV Congreso nacional de antimicrobianos y quimioterapia. Oaxaca, Oax. México. Nov 1997.
- 52.- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M., Bogdan, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 3:783-793. 1994.
- 53.- Murray, HW., Nathan, CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med.* 4:741-746. 1999.
- 54.- Kemp, M., Kurtzhals, JA., Kharazmi, A., Theander, TG. Dichotomy in the human CD4+ T-cell response to *Leishmania* parasites. *APMIS.* 2:81-88. 1994.
- 55.- Tapia, FJ., Caceres-Dittmar, G., Sanchez, MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today.* 4:160-165. 1994.
- 56.- Mosmann, TR., Coffman, RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* 46:111-147. 1989.
- 57.- Mosmann, TR., Cherwinski, H., Bond, MW., Giedlin, MA., Coffman, RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 7:2348-2357. 1986.
- 58.- Muller, I., Kropf, P., Louis, JA., Milon, G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun.* 6:2575-2581. 1994.
- 59.- Lang, T., Hellio, R., Kaye, PM., Antoine, JC. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci.* 107 (Pt 8):2137-2150. 1994.
- 60.- Roberts, LJ., Baldwin, TM., Curtis, JM., Handman, E., Foote, SJ. Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. *J Exp Med.* 185(9):1705-1710. 1997.
- 61.- Blackwell, JM. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitol.* 112 Suppl:67-74. Review. 1996.
- 62.- Roberts, LJ., Baldwin, TM., Speed, TP., Handman, E., Foote, SJ. Chromosomes X, 9, and the H2 locus interact epistatically to control *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol.* 29(9):3047-3050. 1999.
- 63.- Simpson, L., Simpson, AM., Kidane, G., Livingston, L., Spithill, TW. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am J Trop Med Hyg.* 29(5 Suppl):1053-1063. 1980.

- 64.- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J., Bastien, P. The Leishmania genome comprises 36 chromosomal conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*. 24:1688-1694. 1996.
- 65.- Stiles, JK., Hicock, PI., Shah, PH., Meade, JC. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. 93 (8):781-807. 1999.
- 66.- Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M. Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. In *Subcellular Biochemistry*. Vol. 18: Intracellular parasites, eds. Avila, J.L. & Harris, JR. New York: Plenum Press. 131-187. 1992.
- 67.- Gibson, W., Stevens, J. Genetic exchange in the Trypanosomatidae. *Adv Parasit*. 43: 1-46. 1999.
- 68.- Tibayrenc, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasit*. 36:47-115. 1995.
- 69.- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S., Darde, M., Ayala, FJ. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A populations genetics vantage. *Procced Nat Acad Sciens USA*. 88:5129-5133. 1991.
- 70.- Scholler, JK., Reed, SG., Stuart, K. Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 20(3):279-293. 1986.
- 71.- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J., Wincker, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*. 222:107-117. 1998.
- 72.- Segovia, M. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol*. 88(2):123-130. Review. 1994.
- 73.- Beverley, SM. Gene amplification in leishmania. *Annual Rev Microb*. 45:417-444. 1991.
- 74.- Eperon, IC., Janssen, JW., Hoeijmakers, JH., Borst, P. The major transcripts of the kinetoplast DNA of *Trypanosoma brucei* are very small ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res*. 11(1):105-125. 1983.
- 75.- Barker, C. The ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of darkfield electron microscopy images of isolated purified networks. *Micron*. 11:21-62. 1980.
- 76.- Englund, PT., Marini, JC. The replication of kinetoplast DNA. *Am J Trop Med Hyg*. 29(5 Suppl):1064-1069. 1980.
- 77.- Kleisen, MC., Borst, P., Weijers, PJ. The structure of kinetoplast DNA. 1. The minicircles of *Crithidia lucilae* are heterogeneous in base sequence. *Eur J Biochem*. 15:64(1):141-151. 1976.
- 78.- Angelici, MC., Gramiccia, M., Gradoni, L. Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitol*. 99:301-309. 1989.
- 79.- Jackson, PR., Wohlheiter, JA., Jackson, JE., Sayles, P., Diggs, CL., Hockmeyer, WT. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *Amer J Trop Med Hyg*. 33:808-819. 1984.
- 80.- Kapoor, GS., Arora, S., Sehgal, S. Genetic polymorphism of *Leishmania* species using kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphism and cDNA probe of *Leishmania donovani*. *Medical Microbiol and Immunol*. 186:209-214. 1998.
- 81.- Noyes, HA., Reyburn, H., Bailey, JW., Smith, DA. Nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol*. 36:2877-2881. 1998.
- 82.- Spithill, TW., Grumont, RJ. Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. *Mol Biochem Parasitol*. 12:217-236. 1984.

- 83.- Macina, RA., Sanchez, DO., Affranchino, JL., Engel, JC., Frasch, ACC. Polymorphisms within minicircle sequence classes in the kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* clones. *Mol Biochem Parasitol.* 16:61-74. 1985.
- 84.- Macedo, AM., Melo, MN., Gomez, RF., Pena, SDJ. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 53:63-70. 1992.
- 85.- Fernandes, O., Murthy, VK., Kurat, U., Degraeve, WM., Campbell, DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol.* 66:261-271. 1994.
- 86.- Luis, L., Ramirez, A., Aguilar, CM., Eresh, S., Barker, DC., Mendoza-Leon, A. The genomic fingerprinting of the coding region beta-tubulin gene in *Leishmania* identification. *Acta Trop.* 69:193-204. 1998.
- 87.- Fernandes, O., Catanho, MP., Segura, I., Labrada, LA., Derre, R., Saravia, N., Degraeve, W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Parasitol.* 85:563-568. 1999.
- 88.- Mauricio, IL., Howard, MK., Stothard, JR., Miles, MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitol.* 119:237-246. 1999.
- 89.- Sogin, ML., Elwood, HJ., Gunderson, JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:1383-1387. 1986.
- 90.- Ramirez, JL., Guevara, P. The ribosomal gene spacer as a tool for taxonomy of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 22:177-183. 1987.
- 91.- Briones, MRS., Nelson, K., Beverley, SM., Affonso, HT., Camargo, EP., Floeter-Winter, LM. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol.* 53:121-128. 1992.
- 92.- Uliana, SRB., Nelson, K., Beverley, SM., Camargo, EP., Floeter-Winter, LM. Discrimination amongst *Leishmania* by PCR amplification and hybridization with SSU rRNA-derived oligonucleotides. *J Euk Microbiol.* 41:324-330. 1994.
- 93.- Hernández, R., Ríos, P., Valdés, AM., Piñero, D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 41:207-212. 1990.
- 94.- Fernandes, AP., Nelson, K., Beverley, SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:11608-11612. 1993.
- 95.- Maslov, DA., Avila, HA., Lake, JA., Simpson, L. Evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Nature.* 368:345-348. 1994.
- 96.- Landweber, L., Gilbert, W. Phylogenetic analysis of RNA editing: a primitive genetic phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:918-921. 1994.
- 97.- Cupolillo, E., Grimaldi, Jr GM., Momen, H., Beverley, SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 73:145-155. 1995.
- 98.- Schönian, G., Akuffo, H., Lewin, S., Maasho, K., Nylen, S., Pratlong, F., Eisenberger, CL., Schnur, LF., Presber, W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopia* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol.* 106:239-248. 2000.
- 99.- Villalba, E., Ramirez, JL. Ribosomal DNA of *Leishmania brasiliensis*: number of ribosomal copies and gene isolation. *J Protozool.* 3:438-441. 1982.
- 100.- Yan, S., Lodes, MJ., Fox, M., Myler, PJ., Stuart, K. Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Mol Biochem Parasitol.* 103:197-210. 1999.

- 101.- White, TC., Rudenko, G., Borst, P. Three small RNAs within the 10 Kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 14:9471-9489.
- 102.- Hernandez, R., Nava, G., Castaneda, M. Small size ribosomal RNA species in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 8:297-304. 1983.
- 103.- Fernandez, AP., Nelson, K., Beverley, SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:11608-11612. 1993.
- 104.- Maslov, DA., Lukes, J., Jirku, M., Simpson, L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large sub-unit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 75:197-205. 1996.
- 105.- Long, EO., Dawid, IB. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 49:727-764. 1980.
- 106.- El Tai, NO., Osman, OF., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G. Genetic heterogeneity of ribosomal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphism and sequencing. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 94:575-579. 2000.
- 107.- Hillis, DM., Dixon, MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol.* 66:411-453. 1991.
- 108.- Dávila, AMR., Momen, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol.* 94:651-654. 2000.
- 109.- Looker, D., Miller, LA., Elwood, HJ., Stickel, S., Sogin, ML. Primary structure of the *Leishmania donovani* small subunit ribosomal RNA coding region. *Nucleic Acids Res.* 16:7198. 1988.
- 110.- Dams, E., Hendriks, L., Van de Peer, Y., Neefs, JM., Smits, G., Vandembemt, I., De Wachter, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 16:87-173. 1988.
- 111.- Schnare, MR., Collings, JC., Gray, MW. Structure and evolution of the small subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. *Curr Genet.* 10:405-410. 1986.
- 112.- Uliana, SRB., Affonso, MHT., Camargo, EP., Floeter-Winter, LM. *Leishmania*: Genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol.* 72:157-163. 1991.
- 113.- Van Eys, GJJM., Schoone, GJ., Kroon, NCM., Ebeling, SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 51:133-142. 1992.
- 114.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega. 1990.
- 115.- Barrera, H. Información genética. Su estructura, función y manipulación. *Conacyt. Colección Ciencia Básica.* 1992.
- 116.- Hanham, CA., Zhao, FS., Shaw, JJ., Lainson, R. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(2):220. 1991.
- 117.- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory. Second edition.* 1989.
- 118.- Pearson, WR., Lipman, DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:2444-2448. 1988.
- 119.- Pearson, WR., Wood, T., Zhang, Z., Miller, W. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics.* 46:24-36. 1997.
- 120.- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, IB., Nei, M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 17:1244-1245. 2001.

- 121.- Schönian, G., Schnur, L., El Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, AA., Sokolowska-Köhler, W., Presber, W. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans Roy Soc Med Hyg.* 95: 217-224. 2001.
- 122.- Momen, H., Grimaldi, G., Pacheco, RS., Jaffe, CL., McMahon-Pratt, D., Marzochi, MCA. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg.* 34:1076-1084. 1985.
- 123.- Hasiguchi, Y., Gomez, EA., De Coronel, VV., Mimori, T., Kawabata, M., Furuya, M., Nonaka, S., Takaoka, H., Alexander, B., Quizhpe, AM., Grimaldi, G., Kreutzer, RD., Tesh, RB. Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major*-like parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 44:205-217. 1991.
- 124.- Yamasaki, H., Agatsuma, T., Pavon, B., Morán, M., Furuya, M., Aoki, T. *Leishmania major*-like parasite, a pathogenic agent of cutaneous leishmaniasis in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.* 51:749-757. 1994.
- 125.- Katamura, K., Matsumoto, Y., Gomez, EAL., Furuya, M., Hashiguchi, Y. Molecular karyotype characterization of *Leishmania panamensis*, *L. mexicana*, and *Leishmania major*-like parasites: agents of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 48:707-715. 1993.
- 126.- Gardener, PJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*. A review of nomenclature and classification. *Trop Dis Bull.* 74:1069-1088. 1977.
- 127.- Killick-Kendrick, R., Molyneux, DH., Rioux, JA., Lanotte, G., Leaney, AJ. Possible origin of *Leishmania chagasi*. *Ann Trop Med Parasit.* 74:563-565. 1980.
- 128.- Anderson, DC., Buckner, RG., Glenn, BL., MacVean, DW. Endemic canine leishmaniasis. *Vet Path.* 17:94-96. 1980.
- 129.- Mendoza, L., Podetti, M., Chavez, F., Zeledon, R. Visceral leishmaniasis in a dog introduced into Costa Rica. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77:283-284. 1983.

Leishmania mexicana mexicana: Genetic Heterogeneity of Mexican Isolates Revealed by Restriction Length Polymorphism Analysis of Kinetoplast DNA

M. Berzunza-Cruz,* G. Bricaire,† S. Zuluoaga Romero,‡ R. Pérez-Becker,* E. Saavedra-Lira,§ R. Pérez-Montfort,§ M. Crippa-Rossi,* O. Velasco-Castrejón,* and I. Becker*¹

*Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, U.N.A.M., Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, 06726 Mexico City, D.F., Mexico; †Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Autónoma de Campeche, Av. Agustín Melgar, Colonia Lindavista, 24030 Campeche, Mexico; ‡Departamento de Vectores, Secretaría de Salud, Calle 10, No. 286, Colonia Centro, 24000 Campeche, Mexico; and §Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., 04510 Mexico City, D.F., Mexico

Berzunza-Cruz, M., Bricaire, G., Zuluoaga Romero, S., Pérez-Becker, R., Saavedra-Lira, E., Pérez-Montfort, R., Crippa-Rossi, M., Velasco-Castrejón, O., and Becker, I. 2000. *Leishmania mexicana mexicana*: Genetic heterogeneity of Mexican isolates revealed by restriction length polymorphism analysis of kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology* 95, 277–284. *Leishmania mexicana mexicana* isolates from 23 patients with localized, diffuse, and an atypical “pseudodiffuse” form of cutaneous leishmaniasis were obtained in various endemic regions of Mexico. Restriction fragment length polymorphism analysis of kinetoplast DNA was done with nine different endonucleases in addition to an *in vitro* growth pattern analysis. We found that the 23 *L. mexicana mexicana* isolates could be consistently classified into six groups, according to the endonuclease digestion patterns obtained with *Hae*III, *Hpa*II, and *Mse*I. Whereas localized cutaneous leishmaniasis isolates could have any of five patterns, diffuse cutaneous leishmaniasis showed only two patterns and pseudodiffuse cutaneous leishmaniasis consistently showed only one pattern. Thus, a clear correlation among digestion pattern, clinical disease, and geographical localization was obtained for the pseudodiffuse cutaneous leishmaniasis group. Additionally, the *L. mexicana mexicana* isolates could be differentiated into fast- and slow-growing groups. Diffuse cutaneous leishmaniasis isolates were found to be fast growing, whereas localized cutaneous leishmaniasis isolates fell into both categories. In contrast, all pseudodiffuse cutaneous leishmaniasis isolates were slow growing. Here we report the first study in which distinct and persistent genotypic characteristics of kinetoplast DNA heterogeneity within the *L. mexicana mexicana* species could be directly correlated with clinical disease and

its growth behavior, suggesting that a distinctive restriction pattern could have important biological implications. Additionally, this study sheds new light on the biological significance of parasite kinetoplast DNA, since the heterogeneity seems not to be random but to form a distinct pattern. © 2000 Academic Press

Index Descriptors and Abbreviations: Mexican *Leishmania mexicana mexicana* isolates; RFLP pattern of kDNA; correlation with clinical disease; kDNA, kinetoplast deoxyribonucleic acid; RFLP, restriction fragment length polymorphism; LCL, localized cutaneous leishmaniasis; DCL, diffuse cutaneous leishmaniasis; PDCL, pseudodiffuse cutaneous leishmaniasis.

INTRODUCTION

The *Leishmania mexicana* complex is found in the American continent together with the *L. (Viannia) braziliensis* and the *L. donovani chagasi* complexes. The *L. mexicana* complex consists of four species (*L. mexicana mexicana*, *L. mexicana venezuelensis*, *L. mexicana amazonensis*, and *L. mexicana pifanoi*) and their distribution has been extensively analyzed in Central and South America (Carreira 1995; Gomes 1995; Harris 1998; Ponce 1991; Saravia 1998). Yet no data regarding the distribution of these species in Mexico exist, even though cutaneous leishmaniasis is highly endemic

¹To whom correspondence should be addressed. Fax: (525) 761-0249. E-mail: becker@servidor.unam.mx.

and has a wide geographical distribution and a broad spectrum of clinical manifestations (Velasco-Castrejón 1989). The most frequent clinical form is the localized cutaneous leishmaniasis (LCL) known as "Chiclero's" ulcer, which is relatively benign and responds well to antimonial drugs and in which the cellular immune response of patients toward *Leishmania* antigens is intense. Diffuse or anergic cutaneous leishmaniasis (DCL) represents the most virulent polar extreme of the disease in which dissemination of the parasite, associated with severe specific cellular anergy toward the *Leishmania* antigens, is observed. Recently an atypical form of cutaneous leishmaniasis has been found in the state of Tabasco. In these patients, nodules spread slowly along draining lymphatic vessels, in a manner similar to that of sporothricoid leishmaniasis, but since these patients also show a specific anergy toward *Leishmania* antigens and a poor response to antimonial treatments, this clinical form has been named pseudodiffuse cutaneous leishmaniasis (PDCL).

The wide clinical spectra found in Mexico has led to the need of an extensive phenotypic as well as genotypic analysis of *Leishmania* species in Mexico. In this study, 23 *Leishmania* isolates taken from patients with various clinical diseases (LCL, DCL, and PDCL) from different geographical regions throughout Mexico (Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, and Quintana Roo) and which had been previously typified as *L. mexicana mexicana* at the Centro Internacional de Enseñanza Médica, Colombia (CIDEIM) were analyzed. Kinoplast DNA (kDNA) was purified and analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The *in vitro* growth rates for each isolate were also studied. The RFLP analysis revealed genetic heterogeneity within the *L. mexicana mexicana* isolates, which could be grouped into six patterns. Five of the patterns could be found in LCL isolates, whereas only two of these five patterns were found in isolates from DCL patients. In contrast all isolates from the atypical PDCL patients had the same distinctive pattern, totally different from that of the LCL and DCL isolates.

The *in vitro* growth rates of all parasites could be divided into two groups. All DCL isolates belonged to the fast-growing group, whereas all the PDCL isolates belonged to the slow-growing group. LCL isolates were found in both groups.

We were also able to establish a correlation among the restriction pattern, growth rate, and clinical manifestations in PDCL patients, all of which live in a small geographical area in the state of Tabasco.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of parasites from patients. Parasites were isolated from 12 LCL patients in the states of Campeche, Tabasco, Veracruz, Chiapas, and Quintana Roo. The five DCL isolates were obtained from patients in Tabasco and Veracruz. All the six PDCL isolates were taken from patients which resided in a small area of Chontalpa, in the State of Tabasco (see Fig. 1), which is the Mexican state with the highest incidence of all clinical forms of cutaneous leishmaniasis (two of the LCL isolates and the two DCL isolates obtained in Tabasco (Table I), were also from this area).

Parasite strains. The 23 isolates used in this study are listed in Table I. All the isolates had been typified by monoclonal antibodies and isoenzymes either at the CIDEIM or by us, with WHO monoclonal antibodies generously donated by Dr. Farrokh Modabber from the Leishmania Vaccine Steering Committee, World Health Organization (WHO) (Geneva, Switzerland).

The geographic and host origins, as well as international code for each *Leishmania* isolate, are summarized in Table I. In addition to the Mexican isolates, New World reference strains of the *L. mexicana* complex selected by the WHO as reference prototypes (WHO Reference Center Cryobank maintained at the London School of Tropical Medicine and Hygiene) were included in this study and are shown in Table II (Saravia 1985). The reference strains were generously donated by Dr. Nancy G. Saravia, CIDEIM.

Restriction enzyme kDNA analysis. Promastigotes were harvested from mass culture and kDNA was purified as described by Jackson (1984) with slight modifications. Promastigotes were washed three times in cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, at 2500g for 15 min. Pellets containing 10^9 organisms were lysed in 10 vol of lysis buffer (0.15 M NaCl, 0.015 M $\text{Na}_3\text{-citrate}$, pH 7.2, Sarkosyl 1%) and incubated at 37°C for 15 min. The lysate was sheared by one passage (maximum finger pressure) through an 18-gauge needle attached to a 10-ml syringe. The lysate (2 ml) was layered on 6.6 ml of 3 M CsCl (in 0.01 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8.0) overlying 1 ml of 6 M CsCl (0.01 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8.0) in siliconized polyallomer tubes in a Beckman

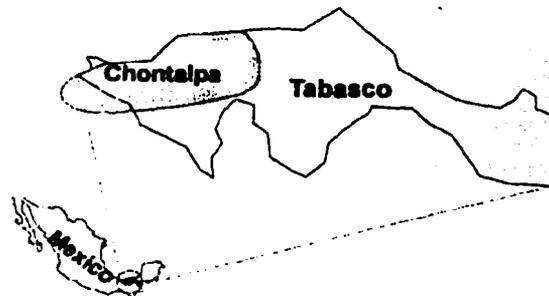


FIG. 1. The Chontalpa Area in the Tabasco State of Mexico, where all the PDCL isolates were obtained.

TABLE I
Mexican *Leishmania mexicana mexicana* Isolates

	Organism	Host	Origin	International code
1	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Tabasco State	MHOM/MX/88/HRC JS
2	² <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Campeche State	MHOM/MX/92/UADY/68
3	³ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Campeche State	MHOM/MX/92/UADY/527
4	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/93/INDRE RHA
5	² <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Quintana Roo State	MHOM/MX/83/UADY/CV
6	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Chiapas State	MHOM/MX/93/INDRE RMH
7	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Tabasco State (Comacalco)	MHOM/MX/88/HRC MC
8	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Quintana Roo State	MHOM/MX/94/INDRE CTC
9	⁴ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Campeche State	MHOM/MX/98/UNAM/RR
10	² <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Campeche State	MHOM/MX/98/UAC GBB
11	³ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Campeche State	MHOM/MX/93/UADY/250
12	³ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, LCL	Campeche State	MHOM/MX/96/UADY/815
13	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, DCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/84/SET GS
14	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, DCL	Veracruz State	MHOM/MX/92/INDRE AM
15	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, DCL	Veracruz State	MHOM/MX/92/INDRE AG
16	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, DCL	Veracruz State	MHOM/MX/92/SET HF
17	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, DCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/93/INDRE FD
18	⁴ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, PDCL	Tabasco State (Comacalco)	MHOM/MX/94/INDRE AMC
19	⁴ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, PDCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/94/INDRE CGM
20	¹ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, PDCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/94/INDRE NBO
21	⁴ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, PDCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/94/INDRE JV
22	⁴ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, PDCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/94/INDRE RC
23	⁴ <i>L. mexicana mexicana</i>	Man, PDCL	Tabasco State (Comalcalco)	MHOM/MX/94/INDRE MC

Note. The parasites were provided by: ¹Dr. Oscar Velasco Castrejón, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), Secretaría de Salud; ²Dra. Guadalupe Bricaire, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Autónoma de Campeche; ³Dr. Fernando Andrade Narvaez, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi," Universidad Autónoma de Yucatán; ⁴isolated in our laboratory.

SW 40ti rotor. The kDNA networks were sedimented by centrifugation at 27,000g for 30 min at 5°C, the cellular lysate and 3 M CsCl were eliminated, and standard saline citrate (SSC) 1× (0.15 M NaCl, 0.015 M Na₂-citrate, pH 7.2) was added. This was followed by 3 washes with SSC 1× and tubes were inverted for 10 min. The pellet containing the kDNA was resuspended in buffer TE (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA). To analyze the sequence relatedness of kDNA from the *L. mexicana mexicana* isolates, samples of kDNA from each of the 23 isolates were digested with nine restriction enzymes *Hae*III, *Hpa*II, *A*luI, *R*saI, *M*boI, *M*seI, *A*paI, *K*pnl, and *D*raI performed under the conditions suggested by the manufacturer (GIBCO, BRL). The digested

material was separated into characteristic banding patterns after electrophoresis in 2% agarose gels in Tris-borate EDTA buffer, at 70 V. Gels were stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide.

Data analysis. Each fragment of digested kDNA, which contributed to a pattern type, was interpreted in a qualitative way. The relative position of each band was compared with all the others for each of the endonucleases tested.

Growth rate analysis. A total of 1 × 10⁶ parasites of all 23 isolates were grown for 96 h at 28°C in 2 ml RPMI (GIBCO, BRL) supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO, BRL). After 96 h samples were taken and counted in Neubauer chambers.

TABLE II
WHO Reference *Leishmania mexicana* Strains

Organism	Host	Origin	International code
<i>L. mexicana mexicana</i>	<i>Nyctomys sumichrasti</i>	Belize	R/BZ/1962/M379
<i>L. mexicana amazonensis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Belem, Pará State, Brazil	VEC/BR/1967/PH8
<i>L. mexicana venezuelensis</i>	Man	Venezuela	MHOM/VE/80/PM-H3

The statistical significance of the difference in the number of parasites from groups I and IV (see below) after growing 96 h in culture was estimated by Student's *t* test.

RESULTS

Restriction length polymorphism analysis. Endonuclease digestion of kDNA of the 23 isolates produced discrete patterns, which could be classified into six groups with the enzymes *HaeIII*, *HpaII*, and *MseI*, as shown in Table III. Each group was established according to the number and localization of bands obtained with the different restriction enzymes. The 23 isolates could be classified in an identical manner with any of the three enzymes.

The schizodeme patterns of *HaeIII*-digested kDNAs of 11 representative strains of *L. mexicana mexicana* isolates are shown in Fig. 2. Interestingly, even though the complete banding pattern differs among the six groups, individual bands are apparently similar among some of the groups.

The digestion with *HaeIII* of isolates of group I showed 4 bands (lanes 2-4). The isolates of group II showed 2 distinct bands (lanes 5-7), isolates of group III consisted of 12 bands (lane 8), isolates of group IV showed 8 bands (lanes 9 and 10), isolates of group V showed 3 bands (lane 11), and isolates of group VI showed 2 bands (lane 12).

The digestions of the same 11 isolates with *HpaII* and *MseI* confirmed the existence of six easily distinguishable digestion patterns in the isolates from *L. mexicana mexicana* (Figs. 3 and 4). With *HpaII* group I (lanes 2-4) had two intense bands and group II (lanes 5-7) showed two bands which seem shared with group I, yet the lower band was much less intense than its equivalent in group I. The digestion pattern of group III (lane 8) was more diffuse with seven clearly distinguishable bands, Group IV (lanes 9 and 10) revealed five bands, group V (lane 11) four bands, and group

TABLE III
Classification of Restriction Patterns of 23 *Leishmania mexicana mexicana* Isolates

Restriction patterns (group)	Isolates of Table I
I	1,2,3,4,5,6,13,14,15,16
II	7,8,17
III	9,10
IV	18,19,20,21,22,23
V	11
VI	12

bp

1,363

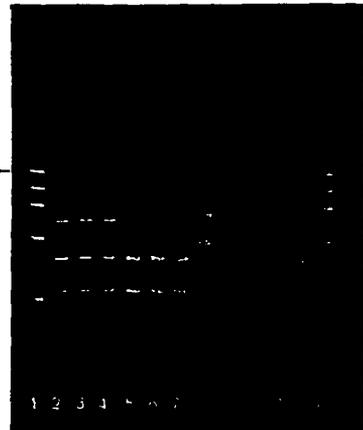


FIG. 2. *HaeIII* restriction endonuclease-digested fragments of kDNA from 11 representative *Leishmania mexicana mexicana* isolates. Lane 1, molecular size markers (ϕ X174 RF DNA/*HaeIII* fragments; GIBCO, BRL); lane 2, isolate GS; lane 3, isolate JS; lane 4, isolate 68; lane 5, isolate FD; lane 6, isolate MC; lane 7, isolate CTC; lane 8, isolate RR; lane 9, isolate AMC; lane 10, isolate CGM; lane 11, isolate 250; lane 12, isolate 815; lane 13, molecular size markers. Group I: lanes 2 (DCL), 3 (LCL), 4 (LCL). Group II: lanes 5 (DCL), 6 (LCL), 7 (LCL). Group III: lane 8 (LCL). Group IV: lane 9 (PDCL), 10 (PDCL). Group V: lane 11 (LCL). Group VI: lane 12 (LCL).

VI (lane 12) two bands. With *HpaII* again, the total number of bands differed between the groups, even though individual fragments are apparently similar between the groups.

The digestion of the 11 isolates with *MseI* revealed that group I (lanes 2-4) showed three bands, group II (lanes 5-7) had one band, group III (lane 8) showed one band, group IV (lanes 9 and 10) showed five bands, group V (lane 11) showed four bands, and group VI (lane 12) showed three bands.

Interestingly, the *L. mexicana mexicana* isolates could consistently be classified into the same six groups with three of the endonucleases used (*HaeIII*, *HpaII*, *MseI*). The only other two endonucleases which revealed patterns that distinguished between groups were *DraI* and *AluI*. Both permitted a clear distinction of five groups (data not shown). In the analysis of the restriction patterns with *ApaI*, *MboI*, *KpnI*, and *RsaI*, no clear difference could be detected between isolates (data not shown).

All the LCL isolates had patterns belonging to any of the groups I, II, III, V, and VI and had no clear geographical distribution. All the DCL isolates could be associated only

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

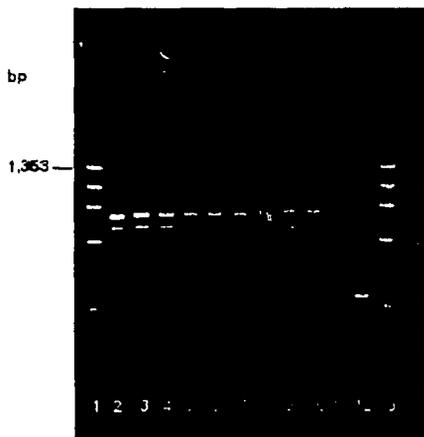


FIG. 3. *HpaII* restriction endonuclease-digested fragments of kDNA from 11 representative *Leishmania mexicana mexicana* isolates. Lane 1, molecular size markers; lane 2, isolate GS; lane 3, isolate JS; lane 4, isolate 68; lane 5, isolate FD; lane 6, isolate MC; lane 7, isolate CTC; lane 8, isolate RR; lane 9, isolate AMC; lane 10, isolate CGM; lane 11, isolate 250; lane 12, isolate 815; lane 13, molecular size markers. Group I: lanes 2 (DCL), 3 (LCL), 4 (LCL). Group II: lanes 5 (DCL), 6 (LCL), 7 (LCL). Group III: lane 8 (LCL). Group IV: lane 9 (PDCL), 10 (PDCL). Group V: lane 11 (LCL). Group VI: lane 12 (LCL).

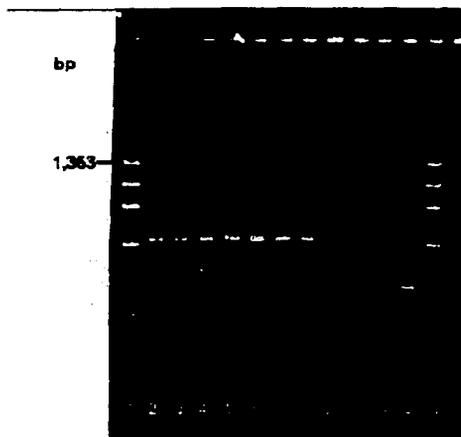


FIG. 4. *MseI* restriction endonuclease-digested fragments of kDNA from 11 representative *Leishmania mexicana mexicana* isolates. Lane 1, molecular size markers; lane 2, isolate GS; lane 3, isolate JS; lane 4, isolate 68; lane 5, isolate FD; lane 6, isolate MC; lane 7, isolate CTC; lane 8, isolate RR; lane 9, isolate AMC; lane 10, isolate CGM; lane 11, isolate 250; lane 12, isolate 815; lane 13, molecular size markers. Group I: lanes 2 (DCL), 3 (LCL), 4 (LCL). Group II: lanes 5 (DCL), 6 (LCL), 7 (LCL). Group III: lane 8 (LCL). Group IV: lane 9 (PDCL), 10 (PDCL). Group V: lane 11 (LCL). Group VI: lane 12 (LCL).

to patterns I or II. Yet most astonishingly, the PDCL isolates always showed only one characteristic pattern: that of group IV. The PDCL isolates were all obtained in one geographical region of approximately 500 km² in the State of Tabasco known as Chontalpa. In this particular case a clear association between a digestion pattern and a clinical disease could be established.

Interestingly, the six basic digestion patterns observed in Mexican isolates of *L. mexicana mexicana* differ totally from the digestion patterns observed with the WHO reference strain of *L. mexicana mexicana*, as well as with the other WHO reference strains included in the *L. mexicana* complex (*L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana venezuelensis*, *L. mexicana pifanoi*) (Fig. 5). The RFLP analysis of the four WHO reference strains of the *L. mexicana* complex digested with *HpaII* is shown in Fig. 5a. *L. mexicana mexicana* M379 showed two bands (lane 2), *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 showed two bands (lane 3), *L. mexicana pifanoi* showed five bands (lane 4), and *L. mexicana amazonensis* PH8 showed two bands (lane 5).

The digestion of the WHO reference strains with *HaeIII*

are shown in Fig. 5b. *L. mexicana mexicana* M379 showed 8 bands (lane 2), *L. mexicana venezuelensis* PM-H3 showed 8 bands (lane 3), *L. mexicana pifanoi* showed 10 bands (lane 4), and *L. mexicana amazonensis* PH8 showed 6 bands (lane 5).

Growth of isolates in vitro. Figure 6 shows that isolates from groups I and II grow approximately twice as much as isolates from groups III, IV, and VI and about 25% more than the isolate of group V after 96 h of *in vitro* culture. Statistical analysis of the mean number of parasites in groups I and IV using Student's *t* test indicated that there is a significant difference with $t = 7.58367$ and $P < 0.00063$.

DISCUSSION

Even though leishmaniasis is endemic in Mexico, little is known regarding the infecting species responsible for a variety of clinical diseases, ranging from the most virulent forms

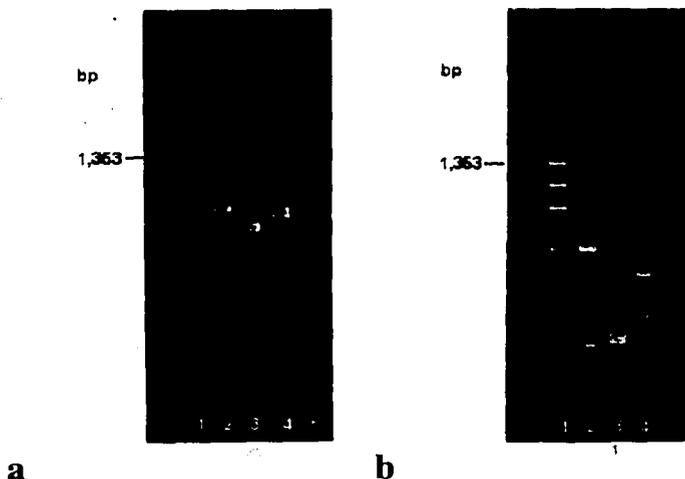


FIG. 5. Restriction endonuclease-digested fragments of WHO reference strains from the *Leishmania mexicana* complex. (a) *Hpa*II: lane 1, molecular size markers; lane 2, M379, *L. m. mexicana*; lane 3, PM-H3, *L. m. venezuelensis*; lane 4, *L. m. pifanoi*; lane 5, PH8, *L. m. amazonensis*. (b) *Hae*III: lane 1, molecular size markers; lane 2, M379, *L. m. mexicana*; lane 3, PM-H3, *L. m. venezuelensis*; lane 4, *L. m. pifanoi*; lane 5, PH8, *L. m. amazonensis*.

of DCL to relatively benign LCL. In this work we analyzed 23 isolates taken from patients with all forms of cutaneous leishmaniasis and from the states with the highest incidences of leishmaniasis. The isolates used in this study had previously been typified with monoclonal antibodies and isoenzymes, revealing that despite the different clinical forms of LCL, PDCL, and DCL, all 23 isolates belonged to the *L. mexicana mexicana* strain. We wanted to analyze genetic heterogeneity in kDNA within the Mexican isolates of *L. mexicana mexicana* in an attempt to find a correlation between the clinical disease and the biological or genetic characteristics of the isolates.

Interestingly, we found that all the Mexican isolates of *L. mexicana mexicana* differed in the endonuclease digestion pattern from that of the WHO reference strain (R/BZ/1962/M379) of *L. mexicana mexicana*, isolated in Belize, Central America. The differences may be due to geographic factors and host factors, since the WHO reference strain was isolated from an insect, whereas the Mexican strains were all isolated from humans. The digestion patterns of the Mexican isolates of *L. mexicana mexicana* also differed from the WHO reference strains for the other species of the *L. mexicana* complex (*L. m. venezuelensis*, *L. m. amazonensis*, *L. m. pifanoi*).

Our results showed substantial but consistent heterogeneity in the restriction pattern of *L. mexicana mexicana* with the use of three endonucleases with 4 bp of recognition sequence. Heterogeneity in the number as well as the intensity of the bands could be separated into six clear patterns in the Mexican isolates. We found that with *Hae*III, *Hpa*II, and *Mse*I, the LCL isolates could show any five (I, II, III, V, VI) of the six different digestion patterns, whereas DCL isolates were present in only two of the patterns (I, II). Yet all the PDCL isolates had the same restriction pattern (IV).

The most remarkable result was the evidence that kDNA analysis could reveal a genetic divergence that correlated with the clinical disease and geographic region in the case of the PDCL isolates. The probability that there are six biologically relevant groups within *L. mexicana mexicana* is high, since it was possible to consistently differentiate each of the 23 isolates into exactly the same group with three different endonucleases.

Interestingly, the growth curve analysis of all 23 isolates enabled detection of two distinct groups of growth patterns. All the parasite isolates of groups I and II revealed a rapid growth pattern that differed from those of groups III, IV, and VI, which had a characteristic slow growth pattern.