



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Detección de *Leishmania mexicana* en murciélagos de la región de los
Tuxtlas, Veracruz, México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Laura Sánchez Pineda

**DIRECTOR DE TESIS:
Ingeborg Dorothea Becker Fauser
CIUDAD DE MÉXICO, 2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Sánchez

Pineda

Laura

5574060250

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310327129

2. Datos del tutor

Dra.

Ingeborg Dorothea

Becker

Fauser

3. Datos del Sinodal 1

Dra.

Livia

Socorro

León

Paniagua

4. Datos del Sinodal 2

Dra.

Fela

Mendlovic

Pasol

5. Datos del Sinodal 3

Dr.

Daniel

Sokani

Sánchez

Montes

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.

Isabel

Cristina

Cañeda

Guzmán

7. Datos del trabajo escrito

Detección de *Leishmania mexicana* en murciélagos de la región de los Tuxtlas, Veracruz, México.

63 p

2019

INDICE

Resumen	8
1. Introducción.....	9
1.1 Generalidades de <i>Leishmania</i>	9
1.2 Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i>	10
1.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	11
1.4 Vectores de <i>Leishmania</i>	13
1.5 Hospederos mamíferos de <i>Leishmania</i>	15
1.6 Distribución de <i>Leishmania</i>	15
1.7 Diagnóstico de <i>Leishmania</i>	18
2. Antecedentes	20
3. Hipótesis	22
4. Objetivos	22
5. Material y método.....	23
5.1 Áreas de estudio	23
5.1.1 Estación biológica “Los Tuxtlas”, Veracruz.....	23
5.1.2 “Cueva de los murciélagos”, Sontecomapan, Veracruz	23

5.1.3 “Laguna Escondida”, Veracruz	24
5.2 Colecta de ejemplares.....	25
5.3 Extracción de DNA	26
5.4 Reacción de la cadena polimerasa	27
5.5 Análisis bioinformático.....	28
6. Resultados	28
6.1 Colecta e identificación de ejemplares	28
6.2 Detección de <i>Leishmania mexicana</i>	29
6.3 Prevalencia de <i>Leishmania mexicana</i>	30
6.4 Análisis bioinformático.....	31
6.5 Análisis filogenético.....	31
7. Discusión.....	32
8. Conclusión.....	38
9. Referencias	38
10. Apéndice	53
10.1 Apéndice I.	54
10.2 Apéndice II	55
10.3 Apéndice III	61

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Medicina, en la unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” por la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A la persona que le dedico esta tesis, es a mi madre, gracias mamá por darme todo, sin una madre como tú, nada de esto hubiera sido posible. Te amo mamá.

Gracias a mi padre, por estar ahí y darme su apoyo.

Gracias a mi hermano, Luis Javier. Esto es para que logres tus metas y tengas esto como un ejemplo de vida.

También, quiero agradecer a las siguientes personas que hicieron de mi estancia en la facultad y durante toda la realización de este proyecto, algo ameno y ligero.

A Daniela Remolina Figueroa, por todo tu apoyo y ánimo para que terminara la tesis y los consejos que me has dado. Valoro mucho tu amistad y compañía. Te amo. Siempre voy a estar para ayudarte, nunca lo olvides. Te admiro mucho.

A Alejandra Reyna Contreras, te amo mucho y me gusta estar contigo como no te imaginas, es divertido y ameno. Gracias por estar conmigo siempre y por abrirme las puertas de tu casa para enseñarme lo hermoso que puede ser la Huasteca Potosina. Siempre voy a estar para lo que necesites.

A Jorge Gustavo Rocha Magaña, la única persona que puedo decir que me conoce al cien. Que sabe todo de mi vida y que siempre está conmigo apoyándome y dando ánimos. Te amo Gucci.

A Diana Salgado García; gracias por tus consejos, eres una persona muy sabia y atinada en tus pensamientos. Te amo Dianita, conocerte fue algo

muy padre para mi vida. Doy gracias que estés en mi vida y seas de mis amigas cercanas.

Y también, en especial agradecimiento a los ejemplos de vida académica que a continuación se mencionan; son muy importantes y me inspiran día con día.

Los admiro y valoro muchísimo.

A Pablo Colunga Salas, GRACIAS. Por todo tu apoyo, cariño y amistad. Siempre puedes contar conmigo de igual manera. Y gracias por la paciencia que me has tenido, sin duda.

A Estefania Grostieta Rojas, GRACIAS. Te admiro mucho, creo que eres una persona valiosa en todos los aspectos y has estado en momentos difíciles para mí. Te quiero mucho. Gracias por enseñarme todo lo que sabes. Siempre estaré muy agradecida contigo.

A Daniel Sokani Sánchez Montes, eres una gran inspiración y tienes mi admiración total. Creo que, sin ti, jamás hubiera sido esto posible, porque todo esto fue por conocerte a ti, y tenerte como profesor. Agradezco tus atenciones y todo lo disponible que has estado conmigo. Gracias de corazón.

A Lucía Álvarez Castillo, gracias por dejarme estar en tu casa y portarte tan bien conmigo, es obvio que te iba a poner porque además TE ADMIRO mucho. Creo que eres una excelente y dedicada investigadora que tiene mucho futuro. Gracias por todo Luci.

A Heliodoro Celis Sandoval, gracias por compartir sus conocimientos conmigo, es algo que valoraré toda mi vida. Gracias por dejarme entrar en su laboratorio y brindarme apoyo siempre.

Otras personas que conocí en este momento de mi vida y que no pueden faltar en esta dedicatoria:

A Yokomi Nisei, gracias por ayudarme e invitarme a ser parte de tu publicación.

Además, otra dedicación especial para el laboratorio de Inmunomodulación y Agentes Patógenos de la Facultad de Medicina, que me apoyaron, acogieron y enseñaron durante todo este proceso.

A Dra. Mayra Cruz, gracias, por enseñarme y ser parte también de mi vida académica. Y siempre tener la disposición para explicarme. Te quiero May.

A la Dra. Fela Mendlovic, gracias por apoyarme, y pensar en mí, para los proyectos.

A Dra. Guillermina Ávila, gracias doctora, por sus enseñanzas durante la estancia de mi servicio, por estar al pendiente también de mí. Gracias totales.

A Dra. Ana Flisser, por acogerme en su laboratorio y dejarme permanecer ahí para que yo pudiese aprender. Valoro mucho que me hayas dejado ser parte de tu laboratorio.

Y a mis amigos especiales del laboratorio: Job Lara Rojas y Mariana Dinazar, gracias por ayudarme siempre. Los quiero mucho. Son los mejores. Y siempre podrán contar conmigo.

Y también va dedicado a mi prima, Samantha Sánchez Laija, que te adoro, como hermana y que siempre vamos a estar juntas, no importa qué.

También se la dedico a mi tía Alma Laija Abreu que ha estado conmigo y con mi familia. Gracias por todo.

A mis abuelitos, Mario Pineda y Catalina Ayala. Son mi inspiración de cada día y los admiro mucho.

Y, por último, pero no menos importante:

A mi tío Víctor Sánchez, que extraño su partida y sus ánimos de seguir estudiando. Gracias, en donde quiera que te encuentres.

A Wanda, siempre fuiste la mejor y cada día te extraño mucho. Espero volverte a encontrar en otra vida. Te amo por siempre gordinflona.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa emergente producida por protozoarios del género *Leishmania*. Este protozooario es transmitido a los humanos por la picadura de mosquitos hembras infectadas del género *Lutzomyia* (en América) y *Phlebotomus* (en el viejo mundo). En México, existen aproximadamente nueve millones de personas en riesgo de infección por *Leishmania*, distribuidas en 13 entidades federativas. En Veracruz, se ha reportado la presencia de *Leishmania* desde 1953, pero pocos han sido los estudios encaminados a la detección de hospederos, sin embargo, en particular de hospederos silvestres. En la región de los Tuxtlas, Veracruz, no existen reportes sobre mamíferos silvestres como hospederos de este género de protozoarios. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Leishmania* sp. en muestras de murciélagos de la región de los Tuxtlas, Veracruz. Para ello, se capturaron 43 murciélagos con redes de niebla durante los meses de abril y mayo del 2016. Los ejemplares, se sacrificaron y se obtuvo el corazón, el cual se fijó en etanol al 96%. La extracción de DNA se llevó a cabo mediante la resina Chelex-100. La detección del género *Leishmania* se realizó mediante la amplificación de un fragmento de ~800 pb del gen codificante para la enzima alanina-aminotransaminasa (*alat*), mediante PCR. Las muestras positivas a *Leishmania*, se secuenciaron y después se realizó un análisis fenético en MEGA6. Se detectó la presencia de DNA de *Leishmania mexicana*, en tres especies de murciélagos: *Pteronotus davyi*, *P. parnelli* y *Artibeus jamaicensis*. Éste es el primer registro de *L. mexicana* en *P. parnellii* y *P. davyi* como potenciales reservorios de *L. mexicana*. Además, representa el primer registro de murciélagos infectados con *L. mexicana* para el estado de Veracruz.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son causadas por la presencia y actividad de uno o más agentes patógenos, entre los que se incluyen virus, bacterias, protozoarios, parásitos y priones (WHO, 2018). Estas enfermedades son transmitidas por diferentes vías que incluyen el contacto directo o indirecto con el patógeno, así como la ingestión (de agua o alimentos), transmisión de fluidos, inhalación de partículas en el aire y la transmisión por vectores, entre los que destacan dípteros, garrapatas, pulgas y piojos (Roque y Jansen, 2014; WHO, 2018).

Las enfermedades infecciosas emergentes, son aquellas que se han originado recientemente o cuya incidencia ha incrementado durante las últimas décadas. El aumento en la incidencia se provoca por el crecimiento exponencial y continuo de las poblaciones humanas, la rápida urbanización y una de las más importantes, la invasión humana a ambientes silvestres (Alvar et al., 2012).

1.1 Generalidades de *Leishmania*

El género *Leishmania* se caracteriza por presentar, como característica distintiva, un cinetoplasto. Esta estructura está formada por una masa circular de DNA dispuesta en forma de red dentro de una mitocondria larga, estrechamente asociada con el cuerpo basal flagelar (Steverding, 2017).

Estos protozoarios son transmitidos a los humanos por la picadura de mosquitos hembras del género *Lutzomyia* (en el continente americano) y *Phlebotomus* [en el viejo mundo] (Roque y Jansen, 2014). Los reservorios silvestres reconocidos para este género de protozoarios son mamíferos pertenecientes al grupo de los cánidos, roedores, marsupiales, hiracoideos, murciélagos y primates (Roque y Jansen, 2014; Guerrero et al., 2017).

1.2 Clasificación taxónomica de *Leishmania*

Leishmania pertenece al reino Protista (Haeckel, 1866), clase Kinetoplastea, subclase Metakinetoplastina, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae, subfamilia Leishmaniinae y género *Leishmania* (Ross, 1903) (Akhoundi et al., 2016).

Hasta el momento, se han descrito 53 especies dentro de este género, de las cuáles, 20 de ellas son patógenas para los seres humanos (Roque y Jansen, 2014; Akhoundi et al., 2016). La clasificación de *Leishmania* está basada en datos moleculares combinados, que dividen las especies de *Leishmania* en dos linajes filogenéticos principales: Euleishmania y Paraleishmania. El linaje de Euleishmania comprende cuatro subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y el complejo de *L. enriettii* (Akhoundi et al., 2016).

1.3 Ciclo de vida de *Leishmania*

Leishmania tiene diferentes estadios que difieren entre sí, en el hospedero vertebrado, se encuentra la forma de amastigote, la cual es intracelular y, por otro lado, cuando se encuentra en el invertebrado, está presente el promastigote, el cual es extracelular flagelado [Figura 1] (Kaye y Scott, 2011).

El ciclo de vida de estos protozoarios se inicia cuando los flebotominos hembras ingieren sangre con macrófagos infectados por amastigotes de reservorios mamíferos (Dostálová y Volf, 2012). Dentro del invertebrado, los amastigotes cambian a promastigotes procíclicos, que se caracterizan por tener un flagelo muy corto en la parte anterior y poca movilidad (Rogers et al., 2002; Dostálová y Volf, 2012).

Después de 48-72 horas, los parásitos se diferencian en las formas móviles llamadas promastigotes nectomonados largos (Rogers et al., 2002; Dostálová y Volf, 2012), estos escapan de la matriz peritrófica del intestino del vector y mientras se trasladan del lumen en el intestino medio, cambian a promastigotes nectomonados cortos. Finalmente, se transforman en promastigotes metacíclicos, los cuales son la forma infecciosa. Estos últimos son liberados durante la siguiente alimentación del vector a través de la regurgitación, ya que las estructuras bucales del díptero se atrofian por efecto del protozoario (Gossage et al., 2003; Kamhawi, 2006; Bates, 2007; Dostálová y Volf, 2012).

Una vez el protozoario entra al hospedero vertebrado, éste se adhiere a la superficie de la célula hospedera (macrófagos, neutrófilos y monocitos) a través del flagelo (Turco y Descoteaux, 1992). Esta adhesión involucra el reconocimiento de las moléculas expuestas en la superficie del parásito, como lipofosfoglicanos [LPG] (Turco y Descoteaux, 1992) y la glicoproteína gp63, lo cual comienza el proceso de internalización del protozoario a las células del hospedero (Russell y Wilhem, 1986; Turco y Descoteaux, 1992).

El proceso de internalización comienza con la formación de pseudópodos, los cuales le permiten al protozoario adherirse a la superficie de los macrófagos y posteriormente internalizarse formando una vacuola parasitófora (Stuart et al., 2008). Dentro de la vacuola, el promastigote metacíclico se transforma en un amastigote, dividiéndose en múltiples ocasiones (Stuart et al., 2008). Después de multiplicarse, se lisa la membrana de los macrófagos, liberando de este modo a los amastigotes en el tejido. Estos amastigotes pueden invadir nuevos macrófagos o ser ingeridos por un nuevo flebotomino hembra durante su alimentación, reiniciando de esta forma el ciclo [Figura 1] (Stuart et al., 2008; Sunter y Gull, 2017).

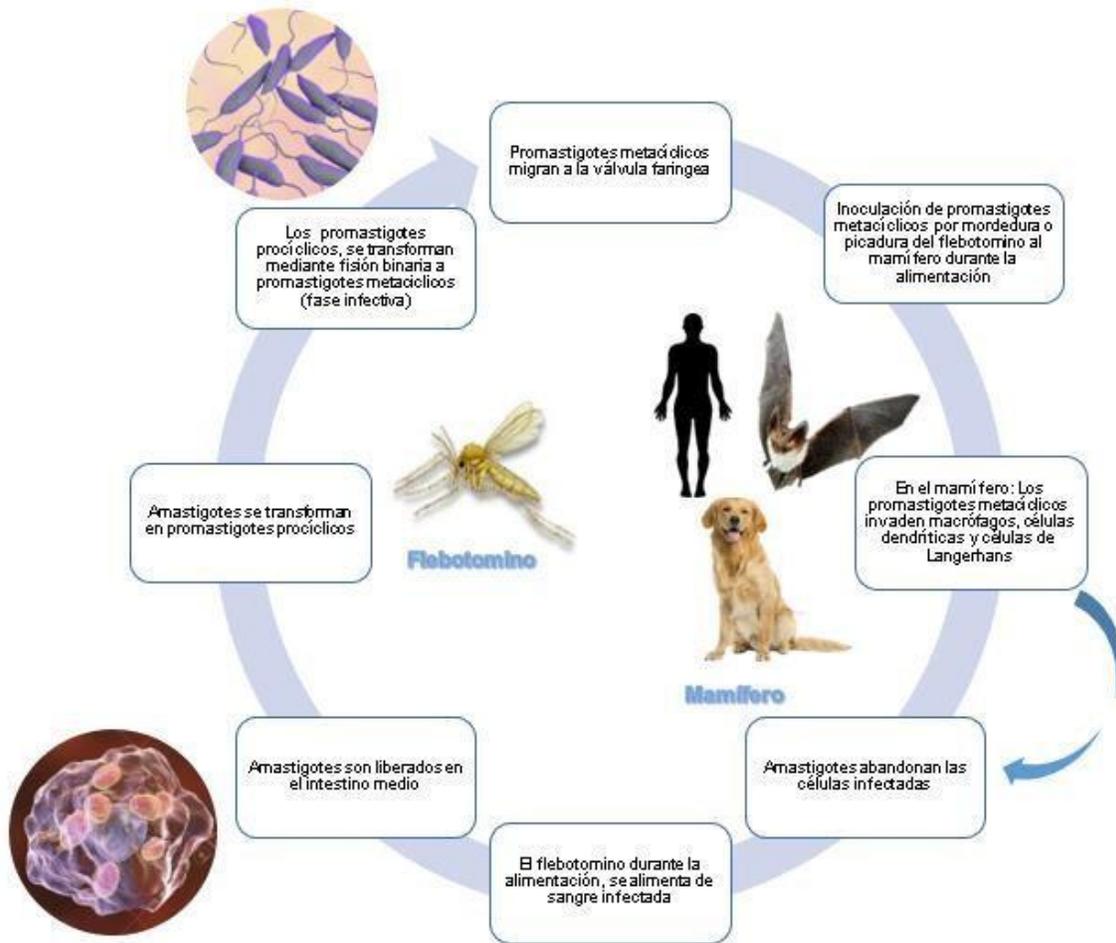


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. Modificado a partir de Stuart et al., (2008); Teixeira et al., (2013); Sunter y Gull, (2017).

1.4 Vectores de *Leishmania*

De las ~800 especies de flebotominos reconocidas, aproximadamente 464 de ellas se encuentran en el Nuevo Mundo y 375 en el Viejo Mundo (Roque y Jansen, 2014; González *et al.*, 2011; González y Stephens, 2012; Akhondi et al., 2016). En la actualidad, la familia Phlebotominae se divide en

seis géneros, tres géneros en el Viejo Mundo, *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Chinius*. Mientras que, en el Nuevo Mundo, se distribuyen los géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* (Hamilton et al., 2015; Akhouni et al., 2016; Lozano et al., 2018).

En México, se han registrado 48 especies de flebotominos que incluye a los géneros *Brumptomyia* y *Lutzomyia* (Ibáñez, 2010; Lozano y Cañeda, 2015). Este último es el más abundante e importante por incluir especies que son responsables de la transmisión de leishmaniasis (Ibáñez, 2000; Sharma y Singh, 2008; Tripathi et al., 2007).

Para México, se han identificado 11 especies antropofílicas, pero sólo un taxón ha sido involucrado en la transmisión de *Leishmania mexicana*: *Lutzomyia olmeca olmeca*. Sin embargo, se ha demostrado que otras especies de flebotominos, como *Lutzomyia cruciata*, *L. panamensis*, *L. shannoni* y *L. ylephiletor* están infectadas con *Leishmania mexicana* (González et al., 2011). En el noreste mexicano, *L. diabolica* y *L. anthophora* han sido involucrados como los hospederos vectores de *L. mexicana* (González et al., 2011). La leishmaniasis causada por *L. infantum* (*L. chagasi*) en México, es transmitida por *L. longipalpis* y *L. evansi* (González et al., 2011).

1.5 Hospederos mamíferos de *Leishmania*

En América, se han identificado siete ordenes de mamíferos involucrados en la transmisión y mantenimiento de diferentes especies del género *Leishmania*: Cingulata, Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Pilosa, Primates y Rodentia (Roque y Jansen, 2014; Akhoundi et al., 2016).

En el caso específico de México, únicamente tres órdenes de mamíferos han sido involucrados como hospederos: Chiroptera, Carnivora y Primates (Rovirosa et al., 2013; Roque y Jansen, 2014). Las especies de mamíferos en las que se ha detectado *Leishmania* con mayor frecuencia son *Canis lupus familiaris* y *Felis silvestris catus* (Cuadro 2), la primera reconocida como el principal reservorio.

En Veracruz, se ha identificado a *Alouatta palliata* y *Alouatta pigra* como hospederos de *Leishmania* (Rovirosa et al., 2013). Por otro lado, Berzunza et al., (2015), reportaron a *Choeroniscus godmani*, *Glossophaga commissarisi*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira parvidens*, como hospederos de *Leishmania*.

1.6 Distribución de *Leishmania*

Las diferentes especies de *Leishmania* se distribuyen en 98 países, principalmente en Centroamérica, Sudamérica, África, Asia y el sur de Europa (Pigott et al., 2014). Aunque algunos estudios han analizado la distribución de la leishmaniasis en diferentes países, aún no se cuenta con el conocimiento certero de la situación de la enfermedad a una escala global (Pigott et al.,

2014). Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis se producen en América, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (Pigott et al., 2014). En América Latina, se estima que alrededor de 60 000 nuevos casos ocurren cada año (Torres et al., 2017).

En lo que respecta a México, de las 21 especies del género *Leishmania* identificadas a nivel mundial, únicamente *L. braziliensis*, *L. chagasi/infantum*, *L. mexicana* y *L. panamensis* han sido reportadas en nuestro país (Cuadro 1).

La mayoría de los casos humanos de leishmaniasis reportados, se han registrado principalmente en el sureste del país, en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Nayarit, Yucatán, Quintana Roo y Campeche (González et al., 2011). También se han registrado casos en el norte del país, en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo y San Luis Potosí [Cuadro 1] (González et al., 2011; INDRE, 2012).

En la mayoría de los casos presentes en México, el agente causal ha sido identificado como *L. mexicana* (INDRE, 2012). Sin embargo, en Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca, también se ha registrado la presencia de *L. braziliensis* (González et al., 2011; INDRE, 2012). Además, se tienen registros de *L. chagasi* como agente causal en los estados de Guerrero, Puebla, Morelos y Chiapas [Cuadro 1] (González et al., 2011; INDRE, 2012, Torres et al., 2017).

Cuadro 1. Especies de *Leishmania* reportadas en México.

Espece de <i>Leishmania</i>	Hospedero mamifero	Método de detección	Lugar de detección	Referencia	
<i>Leishmania</i> sp.	Humanos	PCR	Campeche	Hernández et al., 2015	
	Humanos	PCR	Guerrero	Rosete et al., 2011	
<i>L. mexicana</i>	Perros	ELISA	Yucatán	López et al., 2012	
	Perros	SOD-ELISA	Yucatán	Arjona et al., 2012	
	Humanos	PCR	Hidalgo y Nuevo León	Monroy y Sánchez, 2002	
	Perros	ELISA, Western Blot	Yucatán y Quintana Roo	Longoni et al., 2011 Marín et al., 2007	
	Ratones (BALB/c) Humanos	ELISA	Campeche	Martínez et al., 2008	
	Perro	Isoenzimas, anticuerpos monoclonales	Quintana Roo Tabasco Oaxaca	Velasco et al., 2009	
	<i>Peromyscus yucatanicus</i> <i>Otodylomys phyllotis</i> <i>Desmodus rotundus</i> <i>Choeroniscus godmani</i> <i>Glossophaga commissarisi</i> <i>Glossophaga soricina</i> <i>Stumira parvidens</i> (antes <i>S. lilium</i>) <i>Leptonycteris curasoae</i>	PCR	Campeche	Wynsberghe et al., 2009	
		PCR	México	Berzunza et al., 2015	
	Humanos	PCR	Campeche	Hernández et al., 2015	
	<i>Sigmodon hispidus</i> <i>Oryzomys melanotis</i>	IFA	Campeche	Chablé et al., 1995	
	<i>Alouatta pigra</i> y <i>Alouatta palliata</i>	ELISA, Western Blot, IFA	Veracruz	Rovirosa et al., 2013	
	<i>O. phyllotis</i> , <i>O. melanotis</i> , <i>P. yucatanicus</i> <i>Sigmodon hispidus</i> y Humanos	Anticuerpos monoclonales	Campeche	Canto et al., 1999	
	<i>L. braziliensis</i>	Perros	ELISA	Yucatán	López et al., 2012
		Perros	SOD-ELISA	Mérida	Arjona et al., 2012
Humano		DNA PCR	Hidalgo y Nuevo León	Monroy y Sánchez, 2002	
Perros		ELISA, Western Blot	Yucatán y Quintana Roo	Longoni et al., 2011 Marín et al., 2007	
<i>L. panamensis</i>	Perros	ELISA, Western Blot	Yucatán y Quintana Roo	Longoni et al., 2011 Marín et al., 2007	
<i>L. (Viannia)</i>	<i>O. phyllotis</i> , <i>O. melanotis</i> , <i>P. yucatanicus</i> S. <i>hispidus</i> y humanos	Anticuerpos monoclonales	Campeche	Canto et al., 1999	
<i>L. chagasi</i>	Humano	DNA PCR	Hidalgo y Nuevo León	Monroy y Sánchez, 2002	
<i>L. infantum/chagasi</i>	Perros	ELISA	Yucatán	López et al., 2012	
	Perros	SOD-ELISA	Yucatán	Arjona et al., 2012	
	Perros	Isoenzimas, anticuerpos monoclonales	Quintana Roo Tabasco Oaxaca	Velasco et al., 2009	

ELISA = ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, SOD-ELISA = Superóxido dismutasa-ELISA, IFA = Inmunofluorescencia Indirecta

1.7 Diagnóstico de *Leishmania*

Las técnicas de diagnóstico más utilizadas para la leishmaniasis son ELISA y Western Blot, sin embargo, ambas técnicas presentan desventajas (González et al., 2011; INDRE, 2012, Torres et al., 2017). Por un lado, el ELISA es una prueba donde la sensibilidad y la especificidad están fuertemente influenciadas por el antígeno seleccionado y en algunos casos, se ha probado inespecificidad hacia otros tripanosomátidos, como es el caso de *Trypanosoma cruzi* (Brito et al., 2000; Ravindran et al., 2004; Elmahallawy et al., 2014). En el caso del Western Blot, se cultivan los promastigotes en fase log, después se lisan y se separan en medio SDS-PAGE, finalmente, las proteínas separadas son electrotransferidas en una membrana de nitrocelulosa y probadas en suero de pacientes infectados. Esta técnica provee una respuesta detallada del anticuerpo a diferentes antígenos de *Leishmania*, siendo una técnica más sensible que el ELISA (Brito et al., 2000; González et al., 2011; INDRE, 2012; Ravindran et al., 2004; Elmahallawy et al., 2014; Torres et al., 2017). La principal desventaja de ambas pruebas recae en la imposibilidad de identificar la especie del agente etiológico (Brito et al., 2000; Gonzales et al., 2011; INDRE, 2012; Ravindran et al., 2004; Elmahallawy et al., 2014; Torres et al., 2017).

Otra de las técnicas más utilizadas en el diagnóstico de leishmaniasis, es la reacción de la cadena polimerasa (PCR), la cual consiste en la amplificación (replicación *in vitro*) de segmentos de DNA específicos a partir de

oligonucleótidos (cebadores) involucrados en el objeto de estudio (Soares et al., 2005). Esta herramienta presenta buena especificidad y sensibilidad, pero sobretodo, nos permite identificar la especie y caracterizar los complejos de *Leishmania* presentes en muestras biológicas (Belli et al., 1998; Brenière et al., 1999). Diferentes genes han sido utilizados, sin embargo, los que presentan mayor sensibilidad son los que se encuentran en secuencias multicopias, como el gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rRNA), secuencias repetidas del DNA genómico, secuencias de los minicírculos de DNA del kinetoplasto (kDNA), el gen del locus gp63, que han sido utilizados no sólo para la detección, sino para la identificación de los parásitos (Marfurt et al., 2003). La especificidad puede ser adaptada según la necesidad, a regiones específicas ya sean conservadas o variables (Schallig y Oskam, 2002). Los oligonucleótidos *alat* fueron propuestos por Marco et al., 2015, como unos oligonucleótidos para la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST). El MLST, es un método en el que múltiples genes de mantenimiento no vinculados (generalmente de 4 a 6) se amplifican mediante PCR y posteriormente se analizan mediante secuenciación (Zemanová et al., 2007; Boité et al., 2012).

2. ANTECEDENTES

A nivel global se han encontrado más de 70 especies de murciélagos infectados por al menos 30 especies de tripanosomátidos (Molyneux, 1998; Lima et al., 2012). En Etiopia se reportó por primera vez al género *Leishmania* asociado con murciélagos del Viejo Mundo, *Leishmania tropica* en *Cardioderma cor* y *Leishmania major* en *Nycteris hispida* (Kassahun et al., 2015). En América, Lampo et al. (2000) demostraron que los murciélagos podían ser fuentes de sangre para *Lutzomyia longipalpis* en cuevas venezolanas, años después, en ese mismo país se registró *L. infantum* en la sangre de *Carollia perspicillata* [Cuadro 1] (De Lima et al., 2008).

En Brasil se ha registrado la presencia de *Leishmania* en 10 especies de murciélagos, mientras que en México únicamente se han reportaron como hospederos de *Leishmania* a *Choeroniscus godmani*, *Glossophaga commissarisi*, *G. soricina* y *Sturnira parvidens* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies de murciélagos como hospederos descritos infectados con diferentes especies de *Leishmania* en América (Modificado de Roque y Jansen, 2014).

Orden	Especie hospedera	Especies de <i>Leishmania</i>	Potencial reservorio/ hospedero	País	Referencia
Chiroptera	<i>Carollia perpicillata</i>	<i>L. infantum</i>	Potencial reservorio	Venezuela	De Lima <i>et al.</i> , 2008
	<i>Molossus molossus</i>	<i>L. infantum</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
		<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
		<i>L. (Viannia) sp.</i>	Hospedero	Brasil	Shapiro <i>et al.</i> , 2013
	<i>M. rufus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Glossophaga soricina</i>	<i>L. infantum</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
		<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
		<i>L. (Viannia) sp</i>	Hospedero	Brasil	Shapiro <i>et al.</i> , 2013
	<i>Nycinomops laticaudatus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Eumops glaucinus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>E. auripendulus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Artibeus literatus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Sturnira lilium</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Myotis nigricans</i>	<i>L. amazonensis</i>	Hospedero	Brasil	Savani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Choeroniscus godmani</i>	<i>Leishmania mexicana</i>	Hospedero	México	Berzunza <i>et al.</i> , 2015
	<i>Glossophaga commissarisi</i>	<i>Leishmania mexicana</i>	Hospedero	México	Berzunza <i>et al.</i> , 2015
<i>G. soricina</i>	<i>Leishmania mexicana</i>	Hospedero	México	Berzunza <i>et al.</i> , 2015	
<i>Sturnira parvidens</i>	<i>Leishmania mexicana</i>	Hospedero	México	Berzunza <i>et al.</i> , 2015	

3. HIPÓTESIS

Dado que existe evidencia de murciélagos infectados con *Leishmania* en la zona tropical de África y Sudamérica; se espera encontrar murciélagos infectados con *Leishmania* en la Región de los Tuxtlas, Veracruz, México.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue detectar la presencia de *Leishmania* sp. en muestras de murciélagos de la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Objetivos particulares:

- Estandarizar la prueba de PCR para la detección de *Leishmania* spp. mediante el uso de oligonucleótidos para la amplificación del gen de la *alaninaaminotransaminasa (alat)*.
- Identificar las especies de *Leishmania* circulantes en murciélagos de los Tuxtlas, Veracruz.
- Determinar la prevalencia de *Leishmania* en la región de los Tuxtlas, Veracruz.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

5.1.1 *Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, San Andrés Tuxtla, Veracruz.*

Se localiza a 30 km al NE del municipio de Catemaco, Veracruz. Se encuentra entre los 18°34´ y 18°36´ latitud N y los -95°04´ y -95°09´ longitud O, en la porción sur del estado de Veracruz (Figura 2). Cubre una superficie total de 644 hectáreas, localizadas al oriente del Volcán de San Martín Tuxtla, con un rango altitudinal de 150 a los 700 msnm (Contreras, 1993). El tipo de vegetación predominante es la selva alta siempre húmeda (Álvarez et al., 2016). El clima en la región se divide en dos tipos, húmedo tropical (tipo A) en elevaciones bajas-medias y húmedo con inviernos templados (tipo C) en elevaciones altas (Delgadillo et al., 1999; Estrada, 2007; Álvarez et al., 2016). La temperatura promedio es de 25.3°C con una precipitación anual superior a los 4500 mm (Contreras, 1993).

5.1.2 *“Cueva de los murciélagos”, Sontecomapan, Veracruz.*

Esta localidad se encuentra al SE del estado de Veracruz (18° 30´ 01´ N y 95° 03´ 39.32” O), a 16 km al NE de Catemaco (Figura 2). La zona está rodeada por selvas altas siempre húmedas y presenta un tipo de clima cálido-húmedo, con una temperatura máxima promedio de 27.3°C y una mínima

promedio de 21.5°C con una precipitación anual media de 4,500 mm (Contreras, 1993).

5.1.3 *Laguna Escondida, San Andrés Tuxtla, Veracruz.*

Se localiza al SE de Veracruz, en la región central de Los Tuxtlas. Se ubica entre los 18° 35' N y 95° 06' O a una altitud de 130 msnm. (Figura 2). Al norte limita con la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas". La vegetación original estaba conformada por selva tropical siempre húmeda, sin embargo, en la zona ya es evidente el impacto de las actividades humanas. El clima corresponde a un cálido-húmedo, con lluvias en verano y otoño y una temperatura media anual de 27°C (Contreras,1993; Tobón et al., 2011).



Figura 2. Sitios de colecta ubicados dentro de la región espacial de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” (rosa), Cueva de los Murciélagos (café) y Laguna Escondida, Veracruz (gris).

5.2 Colecta de ejemplares

El trabajo de campo se realizó durante los meses de abril y mayo del 2016, para ello, se utilizaron cuatro redes de niebla para la recolecta de murciélagos en cada localidad. Las cuatro redes permanecieron activas desde las 17:30 hasta las 00:00 h, las cuales se revisaron cada 30 minutos.

Todos los ejemplares fueron liberados de las redes y sacrificados conforme a las directrices de la Sociedad Americana de Mamíferos para el Uso de Mamíferos Salvajes en la Investigación (Sánchez, 2012). Posteriormente, todos los individuos fueron determinados morfológicamente siguiendo la guía

de campo de Medellín et al., (2008). Finalmente, de cada ejemplar se extrajo el corazón, el cual fue fijado (individualmente) en etanol al 96% y refrigerado a -4°C hasta el momento de su procesamiento. Los ejemplares colectados fueron depositados en el Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”, en la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo el catálogo “TUX”.

5.3 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el uso de la resina Chelex-100, de acuerdo con las especificaciones de García-González et al., (2004), para ello, se maceró el corazón, se le agregó 500 µL de una solución de Chelex-100 al 10% la cual se disolvió previamente en agua inyectable a una temperatura de 60°C. Se adicionaron 15 µL de proteinasa *K* a cada muestra y se incubó a 55°C por una hora. Finalmente, se incubó a 100°C por 15 minutos. Las extracciones se almacenaron a -20°C, previo a su uso, se agitaron en un vórtex por 15 segundos y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos (García et al., 2004).

Una vez obtenidas las secuencias, éstas se compararon con los datos disponibles en GenBank mediante el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, por sus siglas en inglés) [\[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi\]](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Este programa encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas, compara las secuencias de nucleótidos con las bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística (NCBI, 2018).

5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de *Leishmania* se realizó mediante la amplificación de un fragmento de ~800 pb del gen codificante para la enzima *alaninaaminotransaminasa*(ALAT)[ALAT.F: 5'-GTGTGCATCAACCCMGGGAA-3' y ALAT.R: 5'-CGTTCAGCTCCTCGTTCCGC-3'] (Marco et al., 2015).

La mezcla de reacción consistió en 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix, 2X Promega Corporation (Madison, WI, USA), 1 µL de cada oligonucleótido ALAT.F/ALAT.R, a una concentración de 2 µM, 2 µl de ADN y 8.5 µl de agua libre de nucleasas. El control positivo de DNA se obtuvo de un cultivo de promastigotes de *Leishmania*, el cual se obtuvo del Laboratorio de Inmunoparasitología, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. El control negativo fue la misma mezcla de reacción con agua destilada libre de nucleasas.

Las condiciones de PCR fueron las especificadas para los oligonucleótidos de acuerdo con Marco et al. (2015). Los productos de PCR fueron corroborados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los geles se tiñeron con el fluorocromo SYTO 60 (Invitrogen, Life Technologies) y se visualizaron mediante el uso del fotodocumentador ODYSSEY CLx (LICOR Biosciences).

Las muestras positivas se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

5.5 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas (Apéndice I), se alinearon utilizando como referencia, secuencias disponibles en GenBank. El alineamiento se realizó en el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) mediante el algoritmo *Clustal W*. Finalmente, se realizó un análisis fenético utilizando *Neighbor Joining* en MEGA 6, aplicando el modelo de sustitución Tamura-3-parámetros, con un valor de Bootstrap de 10,000 réplicas, en MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Esto con el fin de identificar las especies basándose en su similitud con otras referencias.

6 RESULTADOS

6.1 Colecta e identificación de ejemplares

Se recolectaron un total de 43 murciélagos pertenecientes a tres familias, Emballonuridae, Mormoopidae y Phyllostomidae (Cuadro 3). Las especies recolectadas en la Estación Biológica “Los Tuxtles”, se identificaron como *Artibeus jamaicensis*, *Dermanura tolteca* y *Platyrrhinus helleri* (Cuadro 3). Las especies recolectadas en la Cueva de los murciélagos fueron *Pteronotus davyi*, *Pteronotus parnellii*, *Pteronotus personatus* y *Choeroniscus godmani*. Mientras que las especies que se recolectaron en Laguna Escondida fueron únicamente los individuos de *Saccopteryx bilineata*.

La localidad con mayor riqueza fue la Cueva de los murciélagos, con un 50% de las especies colectadas (4/8), seguido por la región de los Tuxtles con

un 37.5% (3/8) y finalmente Laguna Escondida con una sola especie registrada [1/8 = 12.5%] (Cuadro 3)

Cuadro 3. Especies de murciélagos colectadas en las tres regiones de estudio: Estación Biológica “Los Tuxtlas”, Cueva de los murciélagos y Laguna de Escondida, Veracruz.

Familia	Especies	Lugar de colecta	No. de individuos
Emballonuridae	<i>Saccopteryx bilineata</i>	Laguna Escondida	12
Mormoopidae	<i>Pteronotus davyi</i>	Cueva de los murciélagos	13
	<i>Pteronotus parnellii</i>	Cueva de los murciélagos	2
	<i>Pteronotus personatus</i>	Cueva de los murciélagos	1
Phyllostomidae	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Estación Biológica Los Tuxtlas	10
	<i>Dermanura tolteca</i>	Estación Biológica Los Tuxtlas	1
	<i>Choeroniscus godmani</i>	Cueva de los murciélagos	3
	<i>Platyrrhinus helleri</i>	Estación Biológica Los Tuxtlas	1
TOTAL			43

6.2 Detección de DNA de *Leishmania*

Las 3 especies positivas a *Leishmania* fueron *P. parnellii*, *P. davyi*, y *A.*

jamaicensis, siendo *A. jamaicensis*, la especie con el mayor número de ejemplares positivos (2/8 = 25%) (Cuadro 4).

6.3 Prevalencia de *Leishmania mexicana*

El análisis de PCR de los 43 murciélagos mostró que el 6.97% (3/43) de los ejemplares fueron positivos a *Leishmania*. El sitio que exhibió la prevalencia más elevada correspondió a la estación Biológica de Los Tuxtlas con 16.66% (2/12 ejemplares) y el sitio con menor prevalencia fue Laguna Escondida con 0% [0/12 ejemplares] (Cuadro 4).

Cuadro 4. Prevalencia de infección por *Leishmania* sp, en las diferentes especies de murciélagos colectados en la estación Biológica de Los Tuxtlas, Cueva de los murciélagos y Laguna de Escondida, Veracruz.

Familia	Especie	Estación biológica Los Tuxtlas		Cueva de los murciélagos		Laguna Escondida	
		Positivos	% ^a	Positivos	% ^a	Positivos	% ^a
Emballonuridae	<i>Saccopteryx bilineata</i>	-	0 (0/0)	-	0(0/0)	-	0 (0/12)
Mormoopidae	<i>Pteronotus davisi</i>	-	0 (0/0)	1	7(1/13)	-	0 (0/0)
	<i>Pteronotus parnellii</i>	-	0 (0/0)	1	50 (1/2)	-	0 (0/0)
	<i>Pteronotus personatus</i>	-	0 (0/0)	-	0 (0/1)	-	0 (0/0)
Phyllostomidae	<i>Artibeus jamaicensis</i>	2	25 (2/10)	-	0 (0/0)	-	0 (0/0)
	<i>Dermanura tolteca</i>	-	0 (0/1)	-	0 (0/0)	-	0 (0/0)
	<i>Choeroniscus godmani</i>	-	0 (0/0)	-	0 (0/3)	-	0 (0/0)
	<i>Platyrrhinus helleri</i>	-	0 (0/1)	-	0 (0/0)	-	0 (0/0)
PREVALENCIA LOCAL		2	16 (2/12)	2	11 (2/18)	-	0 (0/12)
PREVALENCIA GLOBAL		6.97 (3/43)					

^aPrevalencia por especie ((No. individuos positivos / no. total de individuos) x100).

6.4 Análisis bioinformático

El análisis de BLAST dio como resultado que las secuencias positivas provenientes de las tres especies de murciélagos recuperadas, presentaron una similitud entre 95% y 96% de con *Leishmania mexicana* [XM003873118] (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de identidad entre las secuencias obtenidas durante el estudio con respecto a las secuencias de referencia de GenBank.

Número de acceso	Secuencia de <i>Leishmania</i>	Porcentaje de identidad		
		*Secuencia de procedencia	Nucleótidos empatados	%
XM_003873118.1	<i>L. mexicana</i>	B1	513/539	95
		B3	514/537	96
		B5	516/540	96

*B1. *Artibeus jamaicensis*, B3. *Pteronotus parnelli* y B5. *Pteronotus davyi*.

6.5 Análisis fenético

A partir del análisis fenético, se observó que las secuencias recuperadas se agruparon con las secuencias de *Leishmania mexicana* con valor de soporte de 99. Mientras que en el grupo más cercano se localizan las especies *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. major* como las especies con mayor diferencia (Figura 3).

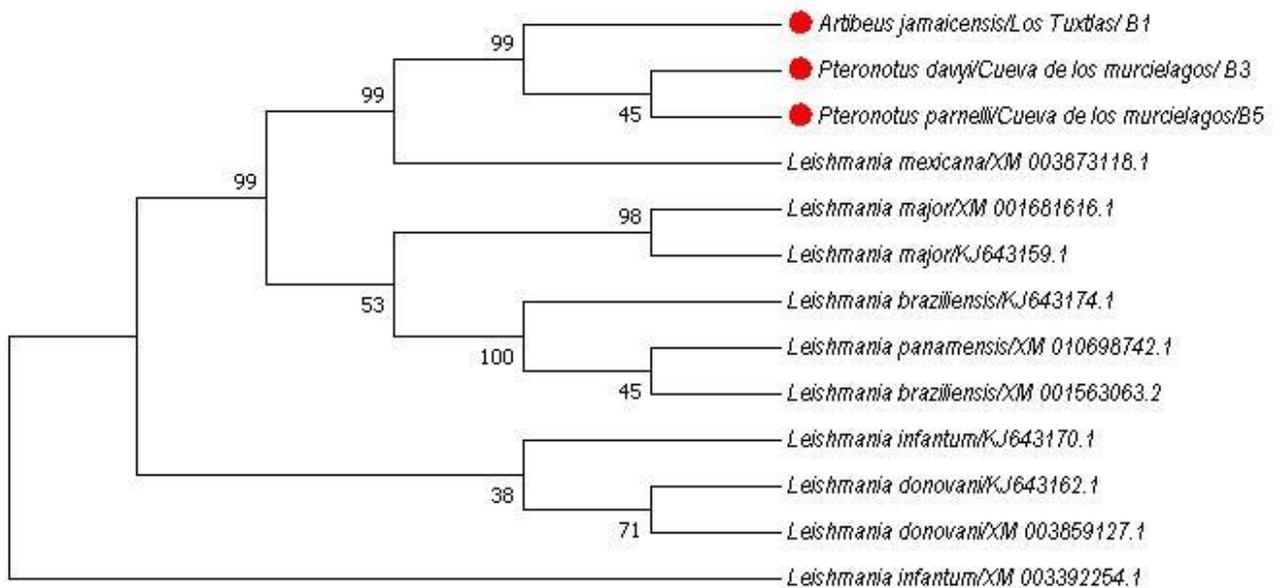


Figura 3. Fenograma generado a partir de las secuencias obtenidas en este trabajo y las de referencia. Se utilizó el método de *Neighbor Joining*. El valor de bootstraps (10,000 réplicas), se muestran junto a los nodos. Las secuencias obtenidas durante este trabajo se señalan con un círculo rojo.

7 DISCUSIÓN

El análisis por PCR con el oligonucleótido (*alat*), para la detección de *Leishmania*, fue exitoso, por lo que se propone como un buen marcador para el género *Leishmania*. El análisis *Neighbor Joining*, indicó, que *L. mexicana*, difiere un 4% de las otras especies de *Leishmania* analizadas. Sin embargo, la correspondencia de un 96% de identidad de las muestras obtenidas en este trabajo con las de referencia, es un confirmatorio de identidad para este patógeno.

En la técnica de MLST propuesta por Marco et al. 2015 para la identificación del género de *Leishmania* los datos de secuencias obtenidas no son ambiguos y los perfiles alélicos de los aislamientos pueden compararse fácilmente con los de una gran base de datos a través de Internet, a comparación de otros procedimientos de tipificación, que involucran la comparación de tamaños de fragmentos de ADN en geles, es por eso que esta técnica es ideal para tipificación del género *Leishmania*.

Este trabajo, registra por primera vez a *P. parnellii* y *P. davyi*, como hospederos de *L. mexicana* a nivel mundial (Savani et al., 2010; González y Stephens, 2012; Shapiro et al., 2013; Berzunza et al., 2015).

La presencia de *Leishmania* está asociada con la presencia del vector, el hospedero mamífero y el tipo de vegetación. En las tres áreas de estudio, el tipo de vegetación es selva alta perennifolia, con una temperatura promedio anual de 20°C a 26°C, posee un dosel amplio que no permite el paso de la luz, razón por la que en este tipo de vegetación, se siembra y cosechan algunos alimentos como el cacao (*Theobroma cacao*), café (*Coffea* sp.) y árboles chicleros (*Manilkara zapota*). Esto es importante debido a que, en estas zonas, se han registrado *Lutzomyia olmeca olmeca*, *L. cruciata* y *L. shannoni*, las cuales se han reportado como vectores de *L. mexicana*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* (González et al., 2011; García et al., 2014).

Estas tres especies de *Lutzomyia*, también están registradas en las tres áreas de estudio, por lo que se consideran zonas con alta probabilidad de

presencia de *Leishmania* (González et al., 2011; García et al., 2014). Considerando lo anterior y las especies de murciélagos positivas en este trabajo, la región de los Tuxtlas puede ser considerada como una zona con un foco enzootico de *Leishmania*.

La relación de los murciélagos como hospederos de *Leishmania* ha sido descrita anteriormente por Feliciangeli (2014), quien menciona que los murciélagos y los flebotominos, con frecuencia comparten hábitats donde existe una gran oportunidad para que los artrópodos se alimenten de los murciélagos. El nicho fundamental para los murciélagos positivos a *Leishmania*, que son mayormente cuevas, tienen una característica fundamental que involucra tanto al hospedero como al vector: las cuevas son zonas húmedas con hojarasca y vegetación, condiciones idóneas para que *Lutzomyia* se desarrolle y por ende, favorezca la presencia de *Leishmania* (Leng, 1987).

Estas condiciones se encontraron en la zona donde *P. parnellii* y *P. davyi* fueron capturadas, lo anterior, puede apoyar la hipótesis de que funjan como hospederos de mantenimiento de *Lu. shannoni* y *Lu. longipalpis*, dípteros que se han registrado en la región de Los Tuxtlas, Veracruz (Feliciangeli, 2014; Kassahun et al., 2015; Velo et al., 2017).

Aunque los murciélagos adultos normalmente abandonan su lugar de percha durante el crepúsculo y la noche, los murciélagos juveniles y algunos adultos permanecen dentro del refugio toda la noche, lo que permite a los

flebotominos alimentarse de ellos y continuar con el ciclo de vida del protozoario (Lampo et al., 2000).

En el caso de *P. parnellii*, este murciélago se ha asociado como un hospedero de mantenimiento de *Lu. longipalpis*, esto quiere decir, que el murciélago es un mamífero del cual el flebotomino se puede alimentar (Lampo et al., 2000). La importancia de esta interacción radica en que *Lu. longipalpis* es vector de *L. donovani*, agente causal de leishmaniasis visceral en sudamérica (Velo et al., 2013). Aunque en México, *Lu. longipalpis* no ha sido identificada como vector de *Leishmania*, esta posibilidad no puede descartarse dada la evidencia en los países de Sudamérica (Gómez et al., 2017)

Pteronotus parnellii, *P. davyi* y *A. jamaicensis*, son especies tolerantes a ambientes perturbados, el hecho de que se hayan encontrado positivos a *Leishmania*, es importante, ya que esta tolerancia puede llevarlos a habitar en zonas peridomiciliarias (APÉNDICE II). Además, debido a estas características, se ha reportado la importancia de estos murciélagos como posibles dispersores de patógenos debido a su amplia distribución (APÉNDICE III) en zonas peridomiciliadas (Salazar y Stephens, 2012), fungiendo como las posibles entradas de los patógenos entre el ciclo selvático y el ciclo urbano (Alemayehu y Alemayehu, 2017; De Rezende et al., 2017).

La prevalencia global de *Leishmania* (6.97%) es menor al compararlo con el único estudio de infección en murciélagos para México donde reportan una prevalencia global de 9%, pero mayor con lo reportado para Veracruz,

dónde no se encontraron animales positivos (Berzunza *et al.*, 2015). Con lo anterior, se puede suponer que la región tropical de “Los Tuxtlas” en Veracruz, puede ser una zona endémica de *Leishmania*, desconociéndose si existe, casos humanos en la zona.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), para que una especie sea reconocida como reservorio de algún patógeno, ésta debe cumplir los siguientes criterios:

1. Sobreposicionamiento entre la distribución espacial y temporal de los vectores y los hospederos.
2. La supervivencia del huésped debe durar el tiempo necesario para permitir la transmisión del patógeno.
3. La misma especie del parásito que infecta a los humanos debe estar presente en el reservorio.
4. La prevalencia de infección debe ser igual o superior al 20%, aunque puede variar con la estacionalidad.
5. Los parásitos deben de ser suficientes en cantidad y deben estar en disponibilidad para que puedan ser transmisibles con facilidad.

Dada la definición de reservorio, y las características que debe tener un reservorio; la única especie que podría ser reconocida como tal, es *A. jamaicensis*. Aunque sólo se hayan encontrado dos ejemplares de *P. parnelli*, faltarían estudios, para considerar a esta especie como reservorio aunque

cumpla con lo establecido anteriormente para ser considerada como tal (; González-Salazar y Stephens 2012; Berzunza et al., 2015).

Por otro lado, *P. davyi*, también cumple la mayoría de los requisitos (puntos del uno al tres de los estipulados por la OMS). En el caso de *L. mexicana*, el criterio número cuatro debería replantearse, ya que las prevalencias de *L. mexicana* en diversos estudios, incluyendo este trabajo, no superan el 12%. Por otro lado, el criterio cinco no se calculó en el presente estudio, por lo que sería el único que faltaría por estimar para proponer a *P. davyi* como reservorios de *L. mexicana*, sin embargo, también faltarían estudios para establecer a esta especie como reservorio. Por lo tanto, sólo se pueden considerar como hospederos de *L. mexicana*.

Leishmania mexicana se distribuye principalmente en el sur y en el este del país, sin embargo, son pocos los trabajos dirigidos al estudio de hospederos y reservorios de esta especie, así como estudios de caso en población humana. Lo anterior, influye en que se desconozca la distribución real del protozooario y sus interacciones con fauna silvestre, fauna peridomiciliada y asentamientos humanos.

Finalmente, a pesar de que el conocimiento de la leishmaniasis ha mejorado en las últimas décadas, principalmente en lo que respecta a la biología molecular (como método diagnóstico), así como en la epidemiología, aún faltan estudios que involucren todos los componentes del ciclo de vida silvestre (hospederos y vectores).

8 CONCLUSIONES

- Primer registro de *L. mexicana* en murciélagos para el estado de Veracruz.
- Primer registro de *L. mexicana* en *P. parnellii* y *P. davyi* como potenciales reservorios de *L. mexicana*.
- El fragmento amplificado de la *alanina-aminotransaminasa*, son recomendables para futuros estudios sobre el género *Leishmania*.

9 REFERENCIAS

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D. 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS Neglected Tropical Disease. 10(3):1-40.
- Alemayehu, B., Alemayehu, M. 2017. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. Health Science Journals. (11)4:516.
- Alvar, J., Velez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLOS ONE 7:e35671.
- Álvarez, S., Barajas, G., Campo, J., León, R. 2016. Inorganic nitrogen and phosphorus in stemflow of the palm *Astrocaryum mexicanum* Liebm. Located in Los Tuxtlas, Mexico. Tropical Ecology, 57:45-55.

- Arjona, G., Villegas, N., López, A., Marín, C., Longoni, S., Bolio, M., Rodríguez, R., Sauri, C., Sánchez, M. 2012. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume (106)4:1:252–258
- Bates, A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal of Parasitology* 37:1097-1106.
- Berzunza, M., Rodríguez, Á., Gutiérrez, G., González, C., Stephens, C. R., Hidalgo, M., Marina, C., Rebollar, E., Bailón, D., Domingo, C., Ibarra, I., Cordero, V., Becker, I. 2015. *Leishmania* (*L.*) *mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1):1-15.
- Belli, A., Rodríguez, B., Aviles, H., Harris, E. 1998. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 58(1):102-9.
- Brenière, F., Telleria, J., Bosseno, F., Buitrago, R., Bastrenta, B., Cuny, G. 1999. Polymerase chain reaction-based identification of new world *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Tropical* 73(3):283-93.

- Brito, E., Mendonca, G., Gomes, M., Jardim, L., Abath, G. 2000. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7: 318-321.
- Boité, M., Mauricio, I., Miles M., Cupolillo, E., 2012. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Disease* 6:e1888.
- Canto, S., Van Wynsberghe, N., Vargas, A., Ojeda, F., Andrade, F. 1999. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* sp. isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz* 94:305–309.
- Contreras, E. 1993. Ecosistemas costeros mexicanos. Comisión Nacional para el uso de la Biodiversidad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México. 415 pp.
- Delgadillo, L. Sommer, I., Martínez, J., Álvarez, J. 1999. Estudio Morfogénico de Algunos Suelos de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 16:81-88.
- De Lima, H., Rodríguez, N. Barrios, M., Ávila, A., Cañizales, I., Gutiérrez, S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela, *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* (103):4.

- Dostálová, A., Volf, P. 2012. *Leishmania* development in sand flies. Parasite-vector interactions overview. Parasite and Vectors. 5:276.
- Elmahallawy, E. Martínez, A., Granger, J., Mallecot, Y., Agil, A., Mari, J., Fernández, J. 2014. Diagnosis of leishmaniasis. The Journal of Infection in Developmental Countries. 8(8):961-972.
- Estrada, A. 2007. Fragmentación de la selva y agrosistemas como reservorios de conservación de la fauna silvestre en Los Tuxtlas, México. En Harvey, A.C. J.C. Saénz (eds). Evaluación y conservación de biodiversidad en paisaje en paisajes fragmentados de Mesoamérica. Eds. Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, 3007:326-348.
- Estrada, A., R. 2001. "*La riqueza de especies de murciélagos en vallas vivas y en corredores de vegetación residual de selva en Los Tuxtlas, México*". Recuperado el 31 de Julio de 2018 en <http://www.csa3.com/htbin/ids52/procskel.cgi>.
- Instituto de Biología: Estación Biológica de Los Tuxtlas, Veracruz. 2012. <http://www.ib.unam.mx/tuxtlas/> Recuperado el 08 de Abril del 2017.
- Feliciangeli, M. 2014. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology 18:71-80.
- Gannon, M., Kurta, A., Rodriguez-Duran, A, Willig, M.. 2005. Bats of Puerto Rico. Texas Tech University Press.

- García, L., Tapia, R., Lazo, P., Ramos, S. 2004. Extracción de DNA con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de Cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringológica* 55: 139-144.
- García, N., Moreno, I., Alvarez, J., De la Cruz, ML., Navarro, A., Sancho, M., García, T., Rodríguez, A., Conty, ML., Toraño, A., Prieto, A., Domínguez, L., Domínguez, M. 2014. Evidence of *Leishmania infantum* Infection in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a Natural Area in Madrid. Spain Biomedical Research Institute: 2014:1-5.
- González, C., Rebollar, A., Ibáñez, S., Becker, I., Martínez, E., Peterson, A., Sánchez, V. 2011. Current knowledge of *Leishmania* vectors in Mexico: how geographic distributions of species relate to transmission areas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 85(5):839-46.
- González, C., Stephens, C. 2012. Constructing ecological networks: a tool to infer risk of transmission and dispersal of leishmaniasis. *Zoonoses Public Health*. 59:179-93.
- Gossage, S., Rogers, M., Bates, A. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal of Parasitology* 33:1027–1034.
- Gómez, C., Bento, E., Rezende, K., Nascentes, G., Barbosa, C., Batista, L., Tiburcio, M., Pedrosa, A., Lages, E., Ramírez, J. 2017. *Leishmania*

infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. *Parasitology*.144(14):1980-1986.

- Godínez, A., Ibáñez, S. 2010. Catálogo de Psychodidae (Diptera) de la colección de artrópodos con importancia médica del InDRE, Secretaría de Salud, México. *Acta de Zoología Mexicana* 26: 99–121.
- Guerrero, E., Cedillo, MR., Esmenjaud, J., Arenas. 2017. *Leishmaniasis: a review*. *F1000 Research*. 6:750.
- Guerrero, A, Luna, ED y González, D. 2004. *Estado taxonómico de Artibeus jamaicensis triomylus inferido a partir de datos moleculares y morfométricos*. *Journal of Mammalogy* 85: 866-874
- Hall, E., K. Koopman, J. Smith. 1997. “*Murciélagos con respaldo desnudo, murciélagos con bigotes o murciélagos con los labios laminados*” (en línea). Consultado el 31 de julio de 2001 en http://www.press.jhu.edu/books/walkers_mammals_of_the_world/chiroptera/chiroptera.Mormoopidae.Pteronotus.html
- Hamilton, T., Votýpka, J, Dostálová A, Yurchenko V, Bird NH, Lukeš J., 2015. Infection Dynamics and Immune Response in a Newly Described *Drosophila-Trypanosomatid* Association. *mBio*. 6:e01356–15.
- Herd, R. 1983. *Pteronotus parnellii*. *Mammalian Species*, 209: 1-5.
- Ibáñez, S. 2000. Los Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) de México. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Ibáñez, S., E. May., Rebollar, E. 2010. Two new species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from Quintana Roo, Mexico. *Zootaxa*, 2448: 26-34.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. 2012. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de Leishmaniasis. http://www.indre.salud.gob.mx/interior/leishmaniasis_en_mexico.html de Recuperado el 07 de Agosto del 2017.
- Kamhawi, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22:439–445.
- Kassahun, J. Sadlova, V. Dvorak, T. Kostalova, D. Frynta, T. Aghova, D. Yasur-Landau, W. Lemma, A. Hailu, G. Baneth, A. Warburg, P. Volf, J. Votypka. 2015. Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents *Acta Tropica.*, 145:39-44.
- Kaye, P., Scott, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews* (9):604-615.
- Lampo, M., Feliciangeli, M., Marquez, LM, Bastidas, C., Lau, P. 2000. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62:718-719.
- Larsen, P., Hooper, S., Bozeman, M., Pedersen, S., Pumo, D., Phillips, CJ, Genoways, H., Baker, R. 2007. Filogenia y filogeografía de *Artibeus*

jamaicensis basada en secuencias de ADN del citocromo b. Journal of Mammalogy 88: 712-727.

•Leng, Y. 1987. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, South-West China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 81: 311–317. pmid:3662673

•Lima, L., Silva, F.M., Neves, L., Attias, M., Takata, C.S., Campaner, M. 2012. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyisp. nov.*, in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. Protist 163: 856–872.

•Longoni, S., Marín, C., Sauri, C., López, A., Rodríguez, R., Villegas, N., Escobedo, J., Barrera, A., Bolio, M., Sánchez, M. 2011. An iron superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. Vector Borne and Zoonotic Disease. 11:815-821.

•Lozano, Y., Colunga, P., Sánchez, L., Sánchez, S., Becker, I., 2018. *Sauroleishmania*, protozoarios asociados con reptiles: distribución, vectores y hospederos. Revista Mexicana de Herpetología. (1):43-52.

- Lozano. Y., Cañeda, I. 2015. Los flebotominos de la estación de biología en Chamela, Jalisco. *Entomología Mexicana* (2): 875-881.
- López, A., Longoni, S., Sauri, H., Sánchez, M., Rodríguez, I., Escobedo, F., Barrera, M., Bolio, M., Marín, C. 2012. *Leishmania* sp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *Scientific World Journal*. (2012):1-10.
- Manada, R. 1983. *Pteronotus parnellii*. *Especies de mamíferos*. (209): 1-5.
- Marco J., Barroso, P., Locatelli, F., Cajal, P., Hoyos, C., M. Nevot, C., Lauthier, J., Tomasini, N., Juarez, M., Estévez, O., Korenaga, M., Nasser, J., Hashiguchi, Y., Ruybal, P. 2015. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: Describing parasite diversity in Argentina. *Infection Genetics and Evolution* 30:308-317.
- Marfurt, J., Niederwieser, J., Makia, N., Beck, H., Felger, I. 2003. Diagnostic genotyping of Old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostics in Microbiology and Infectious Disease* 46:115-24.
- Marín, S., Longoni, H., Mateo, J., Diego, J., Alunda, G., Minaya, S., Sánchez, M. 2007. The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* naturally infected dogs. *Parasitology Research* (101):801–808.
- Martínez, C., Berzunza, M., Becker, I., 2008. El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9. *Gaceta Médica de México* (144):99-104.

- Merritt, J. 2010. *The Biology of Small Mammals*. Baltimore: John Hopkins University Press.
- Medellín, R., Arita, H., Sánchez, O. 2008. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Segunda Edición. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 78
- Monroy, A. Sánchez, G. 2002. Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of *Leishmania* species in Mexico *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:1:S101-4.
- Molyneux, A. (1991). *Trypanosomes of bats*. En *Parasitic Protozoa* Kreier, J. P. and Baker, J. R. (Eds.), (pp. 95–223). Academic Press, New York.
- National Center for Biotechnology Information: Basic Local Alignment Search Tool. 2018. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Consultado el 18 de Agosto 2018.
- NatureServe e IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2007a. *Artibeus jamaicensis*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2012.1. <http://www.iucnredlist.org>. Descargado el 19 de Junio 2018.
- NatureServe e IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2007b. *Pteronotus davyi*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened

Species. Versión 2012.1. <http://www.iucnredlist.org>. Descargado el 19 de Junio 2018.

●NatureServe e IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2007c. *Pteronotus parnellii*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2012.1. <http://www.iucnredlist.org>. Descargado el 19 de Junio 2018.

●Ortega, J., I. Castro-Arellano. 2001. Mammal Species: *Artibeus jamaicensis*. American Society of Mammalogists, 662: 1-9.

●Pigott,D., Bhatt, S., Golding,N., Duda, K., Battle, K., Brady, O., Messina,J., Balard, I., Bastien, P., Pratlong, F., Brownstein, J., Freifeld, C., Mekaru, S., Gething, P.,George, D., Myers, M., Reithinger, R., Hay, S. 2014. Global distribution maps of the leishmaniasis. eLife; 3:e02851.

●Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, K., Goswami, P., Banerjee, D., Ali, N. 2004. Characterization of immunoglobulin G & its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. Infection and Immunology 72: 863-870.

●Rogers, M., Chance, M., Bates, A. 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. American Journal of Primatology (75):1-9.

- Roque, A., Jansen, A. 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* (3):251–262.
- Rosete, D., Berzunza, M., Salaiza, N.,Gonzalez, C. Treviño, N., Ruiz., A., Gudiño., ME., Beltrán, S., Romero, J., Ugarte, A., Rivas, B., Becker., I. 2011. Canine leishmaniasis in México: the detection of a new focus of canine leishmaniasis in the state of Guerrero correlates with an increase of human cases. *Boletín Médico del Hospital Infantil México* (68):97-102.
- Rovirosa, J, Cortés. L., García, F., Guzmán, D., López, A., Caba, M., Ramos, A. 2013. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* en Free-Ranging Howler Monkeys in Southeastern Mexico. *American Journal of Primatology* (5):161-169.
- De Rezende, M., Miraglia, H., Carvalho, C. Anjos, E., Nascimento, C., Araujo, F., Marhino. T., Eleisei, C., 2017. Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. *Transboundary and Emerging Diseases* 64(6):
- Russell, D., Wilhelm, H. 1986. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *Journal of Immunology* 136: 2613–20.
- Savani E., de Almeida M., de Oliveira Camargo M., D'Auria S., Silva M., de Oliveira M. 2010. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology Journal*. 168:5–10.

- Secretaría de Salud. 2016. Leishmaniasis. CDMX. Acciones y programas: Leishmaniasis. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis>

- Shapiro J., Da Costa, M., Dorval M., De Oliveira F., Cepa, F., Bordignon M. 2013. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta de Medicina Tropical* 128:171–174.

- Sharma, U., S. Singh. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal. of Vector Borne Disease* 45: 255–272.

- Schallig, H., Oskam, L. 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health* 7(8):641-51.

- Smithsonian Institution. North American Mammals. Washington DC.

Pteronotus *davyi*

https://naturalhistory.si.edu/mna/image_info.cfm?species_id=485

- Smithsonian Institution. North American Mammals. Washington DC.

Pteronotus

parnellii. https://naturalhistory.si.edu/mna/image_info.cfm?species_id=487&lang=_sp

- Steverding, D. 2017. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. (10):1-10.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 1301–1310.
- Soares, V., Moares, E., Roselino, F. 2005. Polymerase chain reaction in detecting *Leishmania* sp in symptomatic and asymptomatic seropositive dogs. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* (11):4.
- Sunter, J. Gull, K. 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*. (7):1-13.
- Tamura K., Stecher, G., Peterson, D., Filipsk,i A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolutive*. 30:2725-2729.
- Teixeira, D., Benchimol, M., Rodrigues, J., Crepaldi, P., Pimenta, P., de Souza, W. 2013. The cell biology of *Leishmania*: How to teach using animations. *Phatogens PLoS* . 9:e1003594. (b)
- Tobón. W. Martínez, M., Campo, J. 2011. Soil responses to restoration of a tropical pasture in Veracruz, south-eastern Mexico. *Journal of Tropical Forest Science*, 23:338-344.

- Torres, E., Quintanilla, R., Ruiz, J., Arenas, R. 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6:750.
- Tripathi, P., Singh, V., S. Naik. 2007. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51: 229–242.
- Turco, S., Descoteaux, A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology* 46: 65–94.
- Vaughan, N., S. Parsons, K. Barlow, M. Gannon. 2004. Echolocation calls and wing morphology of bats from the West Indies. *Acta Chiropterologica*, 6: 75-90.
- Velo, E., Bongiorno, G., Kadriaj, P., Myrseli, T., Crilly, J., Lika, A., Mersini, K., Di Muccio, T., Bino, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M. 2017. The current status of phlebotomine sand flies in Albania and incrimination of *Phlebotomus neglectus* (Diptera, Psychodidae) as the main vector of *Leishmania infantum* *PLoS One*, p. e0179118.
- Velasco, O., Rivas, B., Munguía, A., Hobart, O. 2009. Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 29:135-140.
- World Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. 2018. Recuperado el 27 de Marzo, 2018 de:
<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34856/LeishReport6>

- Wynsberghe, N., Canto, S., Sosa, E., Rivero, N., Andrade,F. 2009. Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo* 51(2):87-94.
- Young, D., Duncan, M. 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memories of the American Institute of Entomology* 54,881 pp.
- Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I., Miles, M.A., Lukes, J., 2004. Genetic polymorphism within *the Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70:613-61.

10 APÉNDICES

10.1 APÉNDICE I. Secuencias obtenidas de las muestras positivas para

Leishmania

***Artibeus jamaicensis* (B1), Los Tuxtlas, Veracruz.**

GCGAATCTTTTGCTGCAGCTCCTCGTGGGCGGCGGGCGTTCTCGTGATGAT
CCCGGTTCCGCAGTATCCGCTATACTCTGCGCAGATCGCGCTACTTGGCGGGG
TGAAGGTGCCCTACTACCTGCATGGTTCGGAGGAGTGGGTGATAAGTTGCCGAA
TCTTGTTGCCGCGCACGAGCGGTGCGCGGCCGAGAACGGGGCGACGCCGCGT
TGTTTCGTGTGCATCAATCCCGGGAACACGACGGGGAACGTGCTGGAGCGCTGC
GTGATGGATGACGTCGTGCGGTTCTGCCACGAGCGCGACATGCTGCTGCTTGC
GGACCAGGTGTACCAGGAGAACATGTACGACACGCGGCGCCGGTTTTTTGAGCT
TCCGGCAGGTTGCGCTTGGGATGCCTGAGCGTACTGCCCGGAGACGGTGCTTG
TGTCCTTGCACTAGACATCAAAAGGAATGATTGGTGAATGCGGGCGGCGCGGC
GGGTATTTCTGTACGACGAATCTGCCTGATGCGCTGCGCCAGCAGGTTGTGAA
GCTGTG

***Pteronotus parnelli* (B3), Cueva de los murciélagos, Veracruz.**

GTTAATCTTTTGCTGCAGCTGCTCGTGGGCGGCCCGGGCGTGCTGGTGATGGT
CCCGGTTCCGCAGTATCCGCTATACTCTGCGCAGGTCGCGCTACTTGGCGGGG
TGAAGGTGCCCTACTACCTGCATGGTTCGGAGGAGTGGGTGATAAGTTGCCGAA
TCTTGTTGCCGCGCACGAGCGGTGCGCGGCCGAGAACGGGGCGACGCCGCG
GTTGTTTCGTGTGCATCAATCCCGGGAACCCGACGGGGAACGTGCTGGAGCGCT
GCGTGATGGATGACGTCGTGCGGTTCTGCCACGAGCGCGACATGCTGCTGCTT
GCGGACCAGGTGTACCAGGAGAACGTGTACGACACGCGGCGCCGGTTTTTTGAG

CTTCCGCCAGGTTGCGCTTGGGATGCCTGAGCGTACTGCTCGGAGACGGTGCT
TGTGTCCTTGCACTAGACATCAAAAGGAATGATTGGTGAATGCGGGCGGCGCG
GCGGGTATTTCTGTACGACGAATCTGCCTGATGCGCCGCGCCAGCAGGTTGTG
AAGCTGTG

***Pteronorus davyi* (B5), Cueva de los murciélagos, Veracruz.**

GCGAAGCTTTTGTGTCAGCTCCTCGTGGGCGGCGCGGGCGTGCTCGTGAAGG
TCCCGGTTCCGCAGTATCCGCTATACTCTGCGCAGATCGCGCTACTTGGCGGG
GTGAAGGTGCCCTACTACCTGCATGGTCGGAGGAGTGGGTGATAAGTTGCCGA
ATCTTGTTGCCGCGCACGAGCGGTGCGCGGCCGAGAACGGGGCGACGCCGCG
GTTGTTGCTGTGCATCAATCCCGGGAACCCGACGGGGAACGTGCTGGAGCGCT
GCGTGATGGATGACGTCGTGCGGTTCTGCCACGAGCGCGACATGCTGCTGCTT
GCGGACCAGGTGTACCAGGAGAACGTGTACGACACGCGGCCGCGGTTTTTGA
GCTTCCGGCAGGTTGCGCTTGGGATGCCTGAGCGTACTGCTCGGAGACGGTG
CTTGTGTCCTTGCACTAGACATCAAAAGGAATGATTGGTGAATGCGGGCGGCG
CGGCGGGTATTTCTGTACGTCGAATCTGCCTGATGCGCCGCGCCAGCAGGTTG
TGAAGCTGTG

10.2 APÉNDICE II. Biología de las especies positivas a *Leishmania mexicana*.

Pteronotus parnelli

Es un murciélago insectívoro de la familia Mormoopidae, nativo de América Latina que se distribuye desde Sonora (México) hasta el sur de Brasil (Hall, 1997; Estrada, 2001). Su rango de distribución es desde los 0 msnm (áreas

costeras) hasta los 3 000 msnm de altitud. Su hábitat comprende principalmente, bosques húmedos, aunque también se ha asociado a bosques secos caducifolios (Manada, 1983; Estrada, 2001).

Esta especie se encuentra en refugios de cuevas húmedas, donde forman grupos, comúnmente asociados con individuos de otras especies (*Erophylla bombifrons*, *Glossophaga sp.*, *Mormoops megalophylla* y *Pteronotus quadridens*) (Herd, 1983; Gannon et al., 2005).

P. parnellii tiene mechones de pelo que sobresalen a los costados del hocico. Tanto sus orejas como el trago son angostos y puntiagudos y presentan un mentón sin piel. Durante su muda anual, que tiene lugar de mayo a julio, su pelaje cambia de un color marrón oscuro a un naranja brillante (Estrada, 2001). El macho suele ser un poco más grande que la hembra (Estrada 2001). Los murciélagos comienzan a cazar cuando se pone el sol y pueden volar varios kilómetros hacia un lugar de forrajeo, en donde los insectos son abundantes (Estrada, 2001). Los murciélagos permanecen en el aire de 5 a 7 horas antes de regresar a sus refugios. Pueden iniciar su búsqueda de escarabajos y polillas, además de otros insectos, justo antes del amanecer, si todavía tienen hambre (Smithsonian Institution, 2018).



Figura 4. *Pteronotus parnelli* (Juan Cruzado Cortés, 2016).

Pteronotus davyi

Es un murciélago insectívoro, perteneciente a la familia Mormoopidae (Simmons, 2005). Esta especie se encuentra en el noroeste de Perú y el norte de Venezuela hasta el sur de Baja California, Sonora y Nuevo León (México). Esta especie suele ocupar hábitats húmedos o estacionalmente secos en bosques tropicales caducifolios a lo largo de un amplio rango altitudinal. Dentro de estos hábitats, *P. davyi* puede habitar dentro de estructuras artificiales, como casas, gallineros y graneros, pero tiende a preferir los recovecos de cuevas y minas calientes y húmedas. Esta especie tiene alas redondeadas con una relación de aspecto promedio y baja carga de ala, lo que permite una mayor maniobrabilidad en hábitats desordenados (Vaughan et al., 2004). Las

alas se unen a lo largo de la parte media, cubriendo el pelaje dorsal que da la apariencia de espalda desnuda.

Una muda anual da como resultado variaciones en la coloración del pelaje entre dos fases, el marrón se desvanece a marrón pardo rojizo dorsalmente y marrón ventralmente, pero algunos pueden aparecer naranja ocre brillante (Vaughan et al., 2004). El pelaje es fino y está densamente distribuido, pero varía en longitud [8-9 mm debajo de las alas, 4-5 mm en otros lugares] (Vaughan et al., 2004). Los pelos parecidos a cerdas que rodean la boca, probablemente ayuden a atrapar sus presas. Los labios son prominentes, grandes y pueden formarse en forma de embudo, posiblemente utilizados para enfocar las emisiones de ecolocalización en un objetivo específico (Vaughan et al., 2004; Smithsonian Institution, 2018).



Figura 5. *Pteronotus davyi* (Bruce Thompson, 2005).

Artibeus jamaicensis

Es un murciélago frugívoro, perteneciente a la familia Phyllostomidae. Esta especie se encuentra desde Michoacán, Sinaloa y Tamaulipas (México), hasta el noroeste de Colombia, las Antillas Mayores y Menores y Paraguay (Guerrero et al., 2004; Simmons, 2005; Larsen et al., 2007).

Habita desde bosques tropicales de tierras bajas, pero vive en una variedad de hábitats incluyendo bosques xerófilos, bosques templados caducifolios y en asentamientos humanos. Esta especie utiliza una variedad de diferentes perchas, incluyendo árboles ahuecados, follaje denso, cuevas y hasta edificios (Larsen et al., 2007). El rango de distribución abarca desde los 0 msnm hasta los 2 300 msnm (Larsen et al., 2007).

Esta especie pesa entre 40 g y 60 g, y alcanza los 70 mm a 85 mm de longitud con una envergadura de 48 mm a 67 mm de ancho (Ortega y Arellano, 2001;). Su pelaje es corto, variando entre un color marrón, grisáceo o negro (Ortega y Arellano, 2001; Merrit, 2010).

Las raíces del pelo son blancas, dando *A. jamaicensis* un aspecto ligeramente canoso. El pelaje ventral suele ser más ligero que el pectoral y no tiene línea dorsal. El género *Artibeus* se caracteriza por cuatro franjas faciales blancas, una arriba y debajo de cada ojo. Estas rayas son distintos de *A. jamaicensis*; pero es más débil que en otras especies relacionadas (Ortega y Arellano, 2001).

Esta especie carece de una cola externa y el uropatagio desnudo es una característica distintiva de esta especie. Como otros miembros de la familia Phyllostomidae, los miembros de esta especie tienen la hoja nasal desarrollada, amplia, carnosa, y en forma de lanza. *Artibeus jamaicensis* tiene grandes caninos en relación con otros miembros del género (Ortega y Arellano, 2001; Merrit, 2010).



Figura 6. *A. jamaicensis* (Alex Borisenko, Biodiversity Institute of Ontario, 2008).

**10.3 APÉNDICE III. DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO DE LOS RESERVORIOS
POTENCIALES DE *LEISHMANIA MEXICANA***



Figura 7. Distribución en México de *Pteronotus parnellii*. Distribución obtenida de Nature Serve e IUCN (2007 a).



Figura 8. Distribución en México de *Pteronotus davyii*. Distribución obtenida de Nature Serve e IUCN (2007 b).



Figura 9. Distribución en México de *Artibeus jamaicensis*. Distribución obtenida de Nature Serve e IUCN (2007 c).