

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN-LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**



**"DETECCIÓN DE POSIBLES VARIACIONES A NIVEL DEL  
DNA ENTRE *L. chagasi* CAUSANTE DE LEISHMANIASIS  
VISCERAL Y CUTÁNEA ATÍPICA, USANDO MARCADORES  
RAPDs (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)."**

**Tesis para optar al título de:  
Master en Bioquímica Básica y Clínica.**

**Presentado por:  
Lourdes Clementina Callejas Solórzano.**

**Tutores:  
MSc. Edelma Corrales.  
Dr. Antonio Jiménez.**

***ENERO, 2003.***

***AGRADECIMIENTO***

Mi agradecimiento es para todas aquellas personas o instituciones que de una u otra manera contribuyeron para poder llegar a esta meta:

A las autoridades de la UNAN-León y UAH, que permitieron mi participación en esta Maestría.

A los coordinadores Dra. Josefa Toro y Dr. Felipe Urbina por sus gestiones oportunas para llegar a la culminación de este proyecto.

A mis tutores MSc. Edelma Corrales y Dr. Antonio Jimenéz, por transmitirme sus valiosas experiencias que sobre el tema de *Leishmania* poseen.

A todos los profesores de la Maestría, por brindarnos su tiempo y conocimientos.

Al apoyo obtenido por el Departamento de Biología, especialmente el de la Dra. Verónica Díaz por los aportes oportunos hechos a este informe.

Al Departamento de Química, que a través de MSc. Sandra Jirón pude hacer uso de su laboratorio cada vez que necesitaba de éste.

Al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales(PECET), Universidad de Antioquía, Medellín Colombia, por los valiosos aportes hechos por los doctores: Ivan Darío Velez Bernal, Juan Fernando Alzate y Diana Muñoz, a través del correo electrónico.

A MSc. Betzabé Rodríguez de CNDR del MINSA, por atenderme en su centro y brindarme información muy importante para este estudio.

A MSc. William Morales del Departamento de Microbiología y Parasitología, por las fotos y artículos aportados, que fueron de gran utilidad para mi informe.

Al Dr Jorge Huete del Centro de Biología Molecular de la UCA, por dedicarme un poco de su valioso tiempo y facilitarme el suero fetal bovino para los medios de cultivos.

Al Dr.Sergio Valle a través del cual pude obtener mi muestra de sangre para el aislado de *L.chagasi*.

Al equipo de Micorrizas del Departamento de Biología, quienes en cierta forma vigilaban el mantenimiento de mis medios a la temperatura adecuada. Y en especial a María Eugenia Cerda, por su contribución en la obtención de las imágenes presentadas en este informe, en formato office.

A Lic. Sandra Carrión quién me aportó del Bioterio la sangre de conejo necesaria para mis cultivos.

Al Laboratorio Clínico Metropolitano de donde obtuve el agar base sangre para mis cultivos, a través de su propietario y compañero de esta Maestría., Hugo Zambrana.

A todos los compañeros de la Maestría por ser un grupo de gran apoyo, sobre todo gracias a Damaris por tus palabras de ánimo, así como a Xiomara y Laura por la amistad forjada durante estos 3 años de estudios.

A mi esposo Roger por todo el apoyo que siempre me brinda.

A mis padres (Sonia Y Enrique), a mis segundos padres (Clarisa y Roger) y a todas mis hermanas, quienes en cualquier situación de mi vida han estado y estarán para apoyarme.

***DEDICATORIA***

*A MI HIJA, CON TODO MI AMOR.*

***ÍNDICE***

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. CADENA DE TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIASIS.....	3
1.1. AGENTE PATÓGENO.....	3
1.2. VECTOR.....	6
1.3.RESERVORIOS.....	8
1.4.INFECCIÓN EN HUMANO.....	8
2.FUENTE DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN LEISHMANIA.....	11
3.USO DE MARCADORES PARA DETECTAR VARIABILIDAD.....	12
4.MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>LEISHMANIA</i> .....	13
5.PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DEL DNA.....	14
6.GENERALIDADES DE LA TÉCNICA RAPD.....	16
7.ESTANDARIZACIÓN DE LAS REACCIONES RAPD.....	18
8.GENERALIDADES DE LAS EXTRACCIONES DEL DNA.....	22
9.INFECCIONES POR <i>L. chagasi</i> EN NICARAGUA.....	24
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	28
1.AISLAMIENTO DE LOS PARÁSITOS DE <i>L.chagasi</i> .....	28

1.1.TOMA DE MUESTRA.....	28
1.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO LÍQUIDO.....	29
1.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO SÓLIDO.....	30
1.3.1. 3N NORMAL.....	30
1.3.2. 3N MODIFICADO.....	31
2.EXTRACCIÓN DEL DNA .....	32
2.1. PROTOCOLO DE EXTRACCION DEL DNA DE CÉLULAS.....	32
2.2. CHEQUEO, CUANTIFICACIÓN Y DILUCIÓN DEL DNA .....	33
3.AMPLIFICACIONES DEL DNA POR LA TÉCNICA RAPD.....	34
3.1.PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN.....	34
3.2.PROCESOS DE AMPLIFICACIÓN RAPD.....	35
3.3.CHEQUEO DE LA AMPLIFICACIÓN.....	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
1. AISLAMIENTO DE <i>L.chagasi</i> CAUSANTE DE LEISHMANIASIS VISCERAL.....	39
2. ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA DE <i>LEISHMANIA</i> .....	41
3. EXTRACCIONES DEL DNA DE <i>L. chagasi</i> CAUSANTE DE LEISHMANIASIS VISCERAL.....	47
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

***ABREVIATURAS***

am	antes de mediodía.
CDRN	Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.
CTAB	bromuro trimetil amonio de cetilo.
cm	centímetro.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
dNTP	2'-deoxinucleósido 5'trifosfato.
DO	densidad óptica.
EDTA	ácido etilendiaminotetracético.
h	hora.
HEODRA	Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello.
km	kilómetro.
M	molar.
mg	miligramo.
min	minuto.
ml	mililitro.
mM	milimolar.
ng	nanogramo.
nm	nanometro.
PECET	Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales.
PBS	buffer fosfato salino.
pm	después del mediodía.
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar.
RFLP	polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.
rpm	revoluciones por minuto.
RNA	ácido ribonucleico.
SDS	deodecyl sulfato sódico.
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris EDTA.
Tris	2-amino-2(hidroximetil)-1-1-3-propanodiol.

U	unidades de enzima.
UI	unidades internacionales.
UV	ultravioleta.
V	voltios.
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{l}$	microlitro.
$\mu\text{M}$	micrón.
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados.
3N	Nicoll, Navoy y Mc Neal.
3'-OH	3'-hidroxil.

## ***INTRODUCCIÓN***

Se da el nombre de leishmaniasis a una enfermedad infecciosa que afecta la piel, mucosas y vísceras del hombre. Es una multifacética zoonosis producida por diversas especies de parásitos intracelular obligado pertenecientes al género *Leishmania*, que manifiestan un complejo de entidades clínicas con patrones epidemiológicos diferentes (Páiz y Sandoval, 2000).

## ***1.CADENA DE TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIASIS .***

### ***1.1 AGENTE PATÓGENO.***

La *Leishmania* agente causal de la leishmaniasis pertenece al Reino de los Protistas, Sub-reino Protozoa, Phylum Sarcomastigóphora, Sub-phylum Mastigóphora, Clase Zoomastigóphorea, Orden Kinetoplastida, Sub-orden Trypanosomatina, Familia Trypanosomatidae, Género *Leishmania* con complejos de especies los cuales se ubican en dos Sub-géneros: ( Alemán y Alarcón, 1998 )

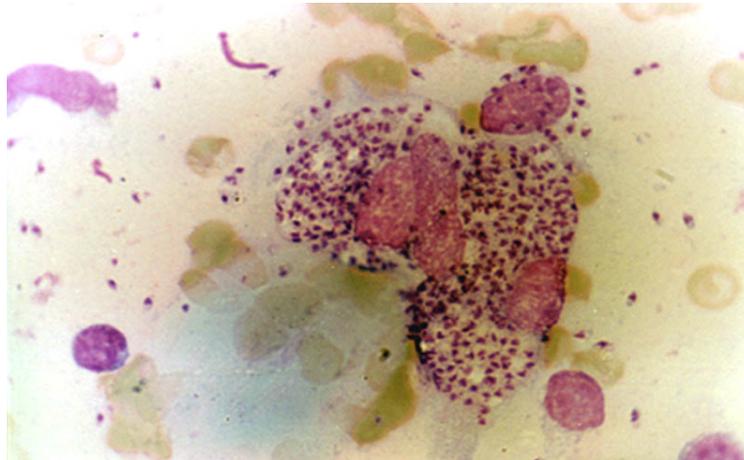
***Leishmania.*** En éste se presentan los complejos de especies causantes de leishmaniasis cutánea: *Leishmania tropica* ( *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* ) en el Viejo Mundo y *Leishmania mexicana* (especialmente *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis* ) en el Nuevo Mundo. Y el complejo de especies *Leishmania donovani* causantes de leishmaniasis visceral con las especies *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo, las cuales también pueden ser causantes de leishmaniasis cutánea (Herwaldt, 1999).

***Vianna.*** Con el complejo de especies *Leishmania braziliensis* ( *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guayanensis* y *L. peruviana*) todas del Nuevo Mundo causantes de leishmaniasis cutánea (Herwaldt, 1999).

De estas especies, las causantes de leishmaniasis mucocutánea son típicamente *L. braziliensis*, pero también *L. panamensis* y *L. guayanensis*, así como además *L. amazonensis* perteneciente al complejo de especies *L. Mexicana* (Herwaldt, 1999).

Todas las *Leishmania* tienen un núcleo, un cinetoplasto y un axonema, los ciclos vitales difieren en cuanto a epidemiología, tejidos afectados y manifestaciones clínicas, pero se caracterizan todas por presentar dos formas distintas en su ciclo de vida:

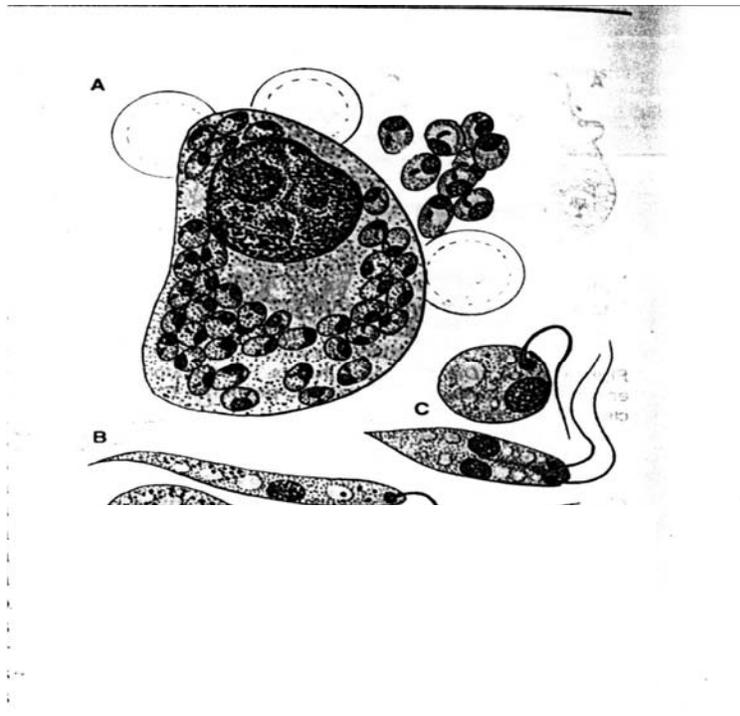
- 1) **Amastigote.** La morfología que presenta esta forma es de un cuerpo ovoide no flagelado de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se multiplica en las células fagocíticas de los hospederos mamíferos donde el parásito es intracelular obligado (Herwaldt, 1999). La presencia de amastigotes es diagnóstica de leishmaniasis y esta fase es infecciosa para el vector (Atias y Neghme, 1994).



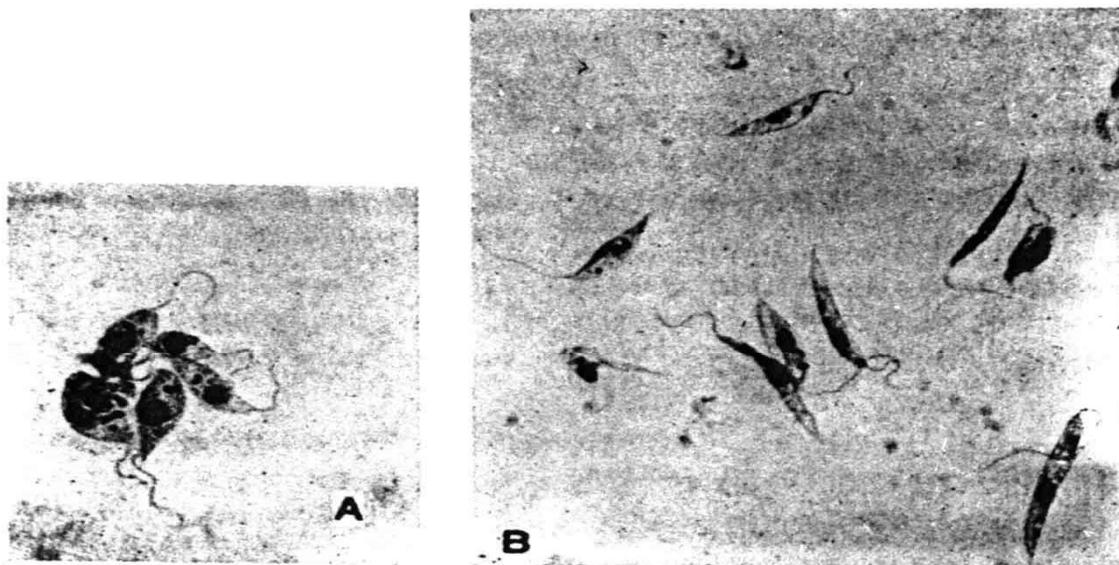
**Foto 1. Macrofago infectado de amastigotes. ( Cortesía MSc. Williams Morales)**

- 2) **Promastigote.** De forma fusiforme (larga y fina), mide de 10 a 20  $\mu\text{m}$  x 1.5-3.5  $\mu\text{m}$ , con un solo flagelo de 15 a 18  $\mu\text{m}$  que sale del axonema en el extremo anterior del cuerpo (Herwaldt, 1999). Se localizan extracelularmente en el vector y constituye la forma móvil e infectante para el huésped (Atias y Neghme, 1994).

Ambas formas evolutivas del parásito se multiplican por fisión binaria siendo en el intestino del vector la multiplicación de los promastigotes (Atias y Neghme, 1994 ). En los cultivos la reproducción tiene lugar de igual manera que en el intestino del vector. La rápida multiplicación de los parásitos da lugar a las llamadas **formas de rosetas.**, en donde varios organismos se disponen con los flagelos entremezclados y dirigidos hacia dentro ( Beaver y col., 1992 ).



**Figura 1. A: Célula reticuloendotelial grande del bazo con amastigotes. B: Promastigotes. C: Forma en división.**



**Figura 2. Formas promastigotes de *Leishmania* en cultivos. A: Formas de rosetas. B: Promastigotes libres.**

## 1.2. VECTOR.

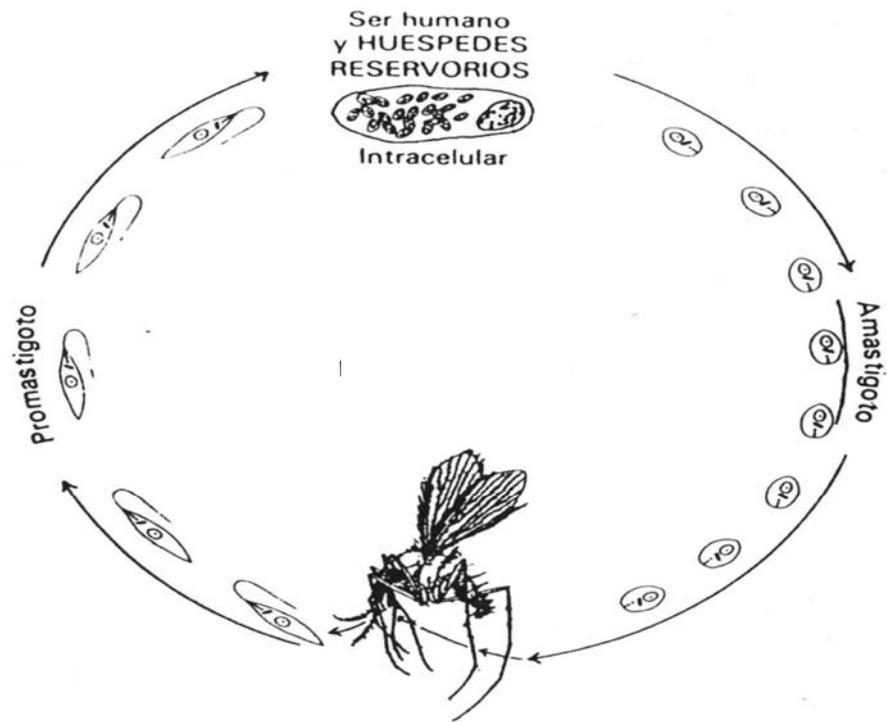


Figura 3. Flebótomo (*Phlebotomus* o *Lutzomyia*), huésped intermediario y vector de *Leishmania*, que capta los amastigotes junto con la sangre succionada de un huésped mamífero infectado para convertirse en el vector en promastigotes.

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de la hembra de diferentes especies de moscas del género *Phlebotomus* en la leishmaniasis del Viejo Mundo y del género *Lutzomyia* en la leishmaniasis del Nuevo Mundo. Reciben nombre tradicionales según los países o territorios en que se encuentran. En Nicaragua se les conoce como jorobados, chirizos, papalomoyos y otros ( Alemán y Alarcón, 2000 ).

Son insectos pequeños, pilosos, de patas largas en relación con el tamaño del cuerpo, con alas casi verticales de color blanco. La máxima actividad de picadura del vector es entre las 5 pm y las 6 am del día siguiente. Están ampliamente distribuidos en regiones selváticas, periselváticas y rurales, rara vez urbana, en estas últimas zonas están parcialmente adaptados al peridomicilio y se encuentra dentro y alrededor de las casas ( Alemán y Alarcón, 2000 ).

Actualmente en el continente americano se conocen cerca de 350 especies vectores de las cuales 90 son antropofílicas lo que las convierte en vectores potenciales de la enfermedad. En Nicaragua en la Región del Pacífico se han identificado la especies *Lutzomyia longipalpis* transmisora de la leishmaniasis visceral y cutánea atípica y *Lutzomyia evansi* en la transmisión de la leishmaniasis cutánea atípica en focos recientes. *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia lephiletor* están ampliamente distribuidas en el país principalmente en zonas endémicas en la región del norte y sur. Están involucradas en la transmisión de leishmaniasis cutánea y mucocutánea ( Páiz y Sandoval, 2000 ).

Las moscas hembras vectores ingieren los amastigotes con la sangre que chupa al picar algún reservorio huésped vertebrado, al llegar al tubo digestivo del vector se transforma en promastigote, que se multiplican en gran número por fisión binaria. Tras su desarrollo esta fase migra a la parte anterior del insecto (proboscis), quedando así preparado para infectar a un nuevo huésped. El desarrollo del parásito dentro del vector toma un tiempo aproximado de 7 a 10 días ( Atias y Neghme, 1994 ).

### **1.3. RESERVORIOS.**

La *Leishmania* utiliza una amplia variedad de vertebrados como reservorios según la localidad (perros, roedores salvajes, perezosos, zarigüeya, oso hormiguero, zorro, lobos, mapaches, chacales). Por lo general hay un huésped reservorio primario en un determinado foco pudiendo afectar a otros vertebrados de la misma zona convirtiéndose éstos en reservorios accidentales o secundarios ( Páiz y Sandoval, 2000 ).

### **1.4. INFECCION EN EL HUMANO**

El humano es un huésped accidental y las manifestaciones patológicas que presenta difieren tanto en su expresión clínica, severidad, en la especie parasitaria que la determina, así como el tipo de vector y área geográfica en que ocurre (Bauver y col.,1992).

La infección humana es iniciada por la picadura de la mosca vector que inyecta los promastigotes en la piel donde pierden el flagelo, pasan a la fase amastigote e invaden las células reticuloendoteliales donde son fagocitados por los macrófagos, monocitos, histiocitos, multiplicándose y provocando lisis celular ( Páiz y Sandoval, 2000 ). Los parásitos liberados vuelven a ser fagocitados y el proceso se repite para producir una lesión cutánea o infección visceral en dependencia de la especie ( Beauver y col., 1992).

Aunque la forma usual de contagio de la leishmaniasis reside en la picadura a seres humanos por las moscas vector, otra vía de transmisión es aquella favorecida por la transfusión sanguínea y el paciente no necesariamente reside en una zona endémica para la infección en cuestión (Aranda- Torrelio, 1996).

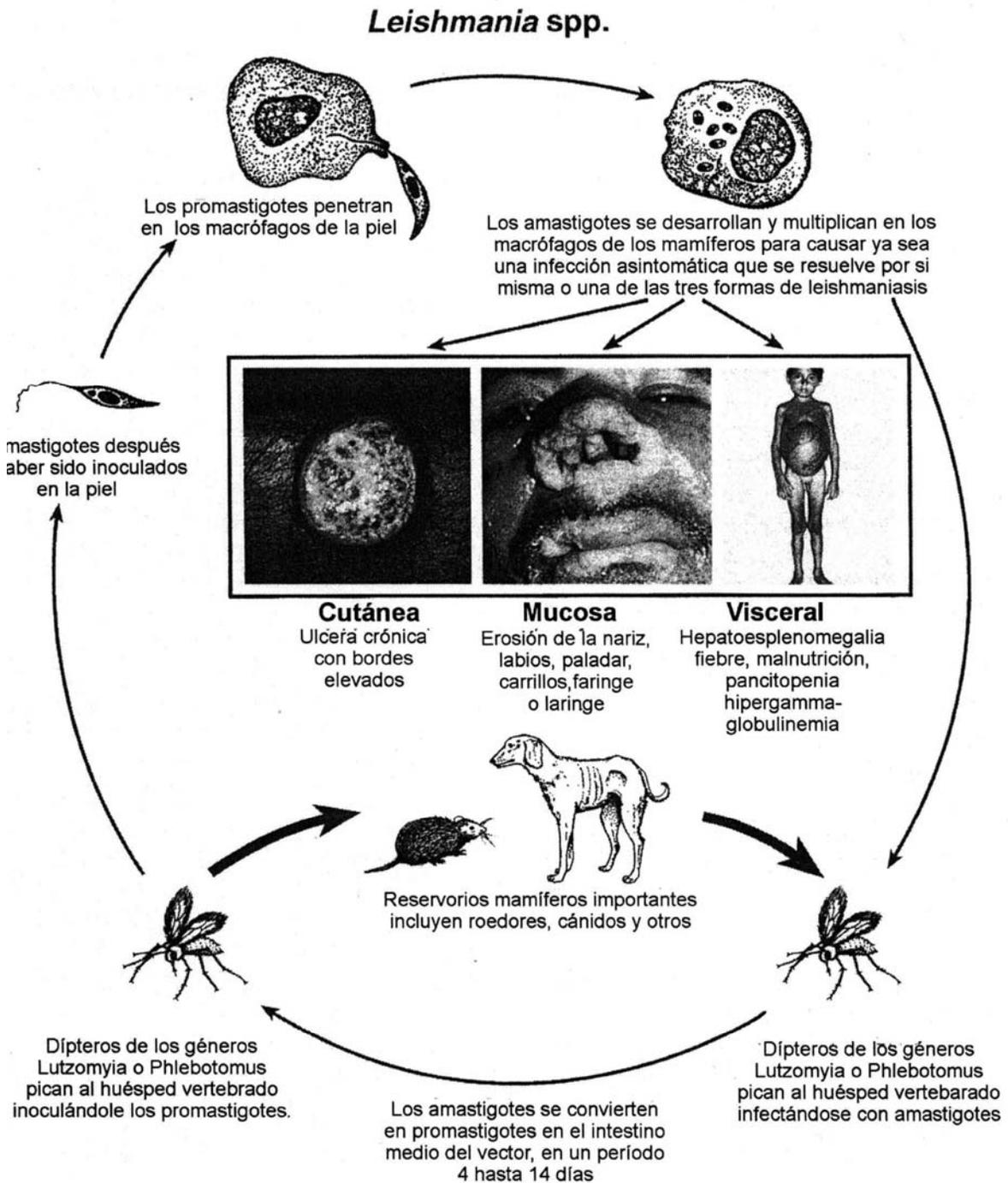
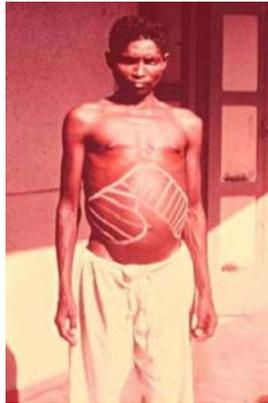


Figura 4. Representación esquemática del ciclo vital de las especies de *Leishmania*.

Páiz y Sandoval (2000), reportan que las distintas especies de *Leishmania* que infectan en Nicaragua y los tipo de síndromes clínicos presentan son:

- 1) **Leishmaniasis Visceral** (LV), que se caracteriza por la capacidad del parásito de infectar tejidos profundos afectando principalmente el hígado, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos. Si no se trata a tiempo puede ser mortal. Se produce por *L. chagasi* (= *L. donovani chagasi*).



**Foto 2 . Paciente con leishmaniasis visceral**

- 2) **Leishmaniasis Cutánea** (LC). Conocida también como "Lepra de Montaña" es la forma mas frecuente. Afecta principalmente las áreas expuestas del cuerpo especialmente en las extremidades y cara formando úlceras redondas con superficie granulosa. Es causada por *L. mexicana*.
- 3) **Leishmaniasis Mucocutánea** (LMC). También conocida como "Espundia", se caracteriza por una úlcera cutánea seguida después de meses o años por lesiones nasofaríngeas destructivas. *L. braziliensis* es la causante de este tipo de leishmaniasis.
- 4) **Leishmaniasis Cutánea Atípica** (LCA). Es la mas reciente que se presenta en el país. Es considerada una variante de la forma cutánea presentando nódulos cutáneos no ulcerados rodeados por un halo despigmentado principalmente en la cara. Se ha identificado que es causada por *L. chagasi* la misma especie involucrada en la leishmaniasis visceral.

## **2.FUENTE DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN LEISHMANIA.**

Organismos con reproducción asexual como *Leishmania* dependen de la mutación para su variabilidad. La mutación es el proceso por el que los genes cambian de una forma alélica a otra; al nivel de DNA se define como cualquier cambio que se produzca en la secuencia de DNA ( Ville et al., 1996 ).

En organismos sexuales la mutación es considerada de poca influencia en la producción de fenotipos selectivamente importantes comparados con la recombinación genética. Sin embargo en los microorganismos la extrema rapidez de la división permite inclusive que una tasa de mutación baja pueda proveer toda la variabilidad necesaria para que pueda operar la selección, capacitando al organismo a mantenerse ante cualquier deterioro del ambiente, como pueden ser la respuesta inmunológica en los hospederos de *Leishmania* o los cambios ambientales que estos parásitos experimentan en su migración a través del aparato digestivo del vector ( Peters and Killick-Kendrick, 1987 ).

La mutación ante la ausencia de procesos de recombinación genética en *Leishmania* puede ser todo lo que se requiera para la plasticidad evolutiva dentro del género. Mutaciones que producen cepas de bacteria resistente a antibióticos y resistencia de los insectos al DDT son ejemplos bien conocidos de adaptación de los organismos a cambios de su ambiente, de manera similar es razonable suponer que la mutación facilita la adaptación de parásitos de *Leishmania* a nuevos vectores y a hospederos vertebrados, en los cuales, si el aislamiento es suficiente, puede alcanzar un nuevo nivel de especie ( Peters and Killick-Kendrick, 1987 ).

La variabilidad se expresa en polimorfismo. Un polimorfismo genético puede definirse como la ocurrencia regular o simultánea en la misma población o especie de dos o mas variantes o genotipos discontinuos. Una vez reconocida la existencia de variabilidad genética en una población, un primer paso consistiría en el análisis de dicha variabilidad lo mas exactamente posible a través de marcadores ( Gallegos, 1994).

### **3.USO DE MARCADORES PARA DETECTAR VARIABILIDAD.**

- **Los marcadores morfológicos**, corresponden a caracteres fenotípicos y pueden ser usados como marcadores genéticos, pero no son suficiente para hacer una verdadera estima de la variabilidad existente, además suelen estar afectados frecuentemente por condiciones ambientales (Gallego, 1994).

Mas recientemente se han desarrollado métodos alternativos basados en el estudio del genoma que comprenden un análisis indirecto (productos codificados por dicho genoma) o directo (propiamente el DNA); estos métodos son los llamados marcadores bioquímicos y moleculares (Gallego, 1994).

- **Los marcadores bioquímicos**, corresponden a la parte del genoma que es traducida en proteínas, su estudio se realiza mediante electroforesis y los marcadores de este tipo mas utilizados son las izoenzimas. Se basan en el principio evidente de que si la información contenida en forma de secuencia de bases del DNA constituyente de un gen, es transformada de forma exacta y colineal a una secuencia de aminoácidos de una proteína, entonces si una proteína es variable el gen correspondiente también lo es. Estos marcadores presentan el inconveniente de que no todos los cambios a nivel del gen son detectados al nivel de proteína, además de que pueden no representar una muestra real de todo el genoma (solo las secuencias codificantes) (Gallego, 1994).

- **Los marcadores moleculares**, como los obtenidos a través de las técnicas de amplificación de DNA, exploran directamente en el genoma analizando así tanto las secuencias codificantes y no codificantes y permiten analizar un gran número de muestras en corto tiempo, identificando polimorfismo no sujetos a condiciones del ambiente (Gallego, 1994).

Las técnicas de amplificación de DNA se basan en la síntesis enzimática *in vitro* de fragmentos o secuencias de DNA en forma similar a los procesos de replicación del DNA *in vivo*. La replicación del DNA consiste en un proceso por el cual la molécula de doble

cadena del DNA es capaz de autoduplicarse ella misma sintetizando dos nueva moléculas de DNA en forma semiconservativa ( Ville et al., 1996 ).

La caracterización bioquímica y molecular de especies dentro del género de *Leishmania* ha revelado mucha heterogeneidad genética dentro de la población. La fuente de la diversidad genética entre *Leishmania* es por su reproducción asexual. Variaciones genéticas son extensivas con algunos clones ampliamente distribuidos y otros parecen únicos y localizado en un foco endémico particular (Cupolillo y col., 1998).

#### **4. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LEISHMANIA.**

El género *Leishmania* ampliamente distribuido en la naturaleza incluye algunas especies prácticamente idénticas desde el punto de vista morfológico. Métodos alternativos para la identificación de complejos y especies de *Leishmania* incluye técnicas tales como perfil electroforético de una batería de izoenzimas (análisis cimodemo), pruebas inmunológicas con anticuerpo monoclonal (análisis serodemo) y técnicas moleculares clásicas incluyendo análisis de restricción de DNA del cinetoplasto (análisis esquizodemos). El DNA minicírculo del cinetoplasto está presente en un gran número de copias (aproximadamente 10.000 por célula), conteniendo secuencias muy conservadas y secuencias variables entre especies (Harris y col., 1998).

En a la aplicación de técnicas moleculares como la amplificación de DNA, Harris y col., (1998), reportan que muchas técnicas basadas en PCR, han sido desarrolladas y usadas en el diagnóstico de leishmaniasis. PCR es capaz de detectar *Leishmania* al nivel de género y distinguir complejos individuales de *L. braziliensis*, *L. mexicana* o *L. donovani*, por la amplificación de secuencias específicas del DNA del minicírculo o del miniexon, así como también se ha logrado con PCR la identificación de los tres complejos simultáneos . Algunos métodos basados en PCR tales como PCR-RFLP y PCR-hibridación han sido descritos para la identificación de especies. También análisis RAPD han sido usados para la identificación a nivel de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, aunque éste requiere DNA purificado y

una alta estandarización de las condiciones de amplificación, pero tiene la ventaja que es un método rápido y sencillo, lo que constituye una herramienta muy usada en la búsqueda al azar de variaciones a nivel de DNA.

La PCR puede ser usada para la identificación de complejos de *Leishmania*, pero no reemplaza todavía los análisis de cimodemo y serodemo para la caracterización de *Leishmania* (Belli y col., 1998). Los análisis cimodemo, al igual que los esquizodemos son largos procesos que requieren de cultivos de parásitos a gran escala. Los anticuerpos monoclonales pueden ser promisorio para la identificación de especies por análisis serodemo, pero los patrones de reactividad varían significativamente dependiendo del origen geográfico de los parásitos. (Harris y col., 1998), además se pueden dar infecciones mezcladas de *Leishmania* y *T. cruzi*, donde estas pruebas estarían sujetas a la reactividad cruzada de los antígenos relacionados en los dos parásitos (Belli y col., 1998).

## **5. PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DEL DNA.**

Las técnicas de amplificación del DNA son sencillas y rápidas de realizar, pues el principio de éstas consiste en combinar una muestra de DNA con oligonucleótidos (primers), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y una enzima (Taq polimerasa) termoestable, con un buffer que le proporciona a la enzima las condiciones adecuadas para que realice su actividad enzimática. La amplificación se realiza en termocicladores programables que realizan ciclos repetitivos, donde la muestra se somete a calentamiento y enfriamientos que permiten los siguientes procesos (Messner y col., 1994).

- **Desnaturalización del DNA.** La doble cadena del DNA es desnaturalizada por incubación a altas temperaturas de 95 °C. Las cadenas disociadas se mantienen libre en la solución mientras la temperatura desciende lo suficiente para que se realice el siguiente paso (Messner y col., 1994).

- **Hibridación del Primer.** A la temperatura de 40-60 °C los primers hibridan (o se sitúan en cada región del DNA) por complementaridad de bases, cada región que será amplificada es hibridizada por 2 primers en orientación inversa, por lo tanto, cada uno de ellos se sitúa en una de las cadenas opuestas con el final 3' hidroxil dirigido el uno hacia el otro ( Messner y col., 1994).

- **Extensión del Primer.** Un incremento de la temperatura a 72 °C después de la hibridación, permite a la enzima DNA polimerasa iniciar la extensión del primer, añadiendo en dirección 5'---> 3' los dNTPs al final 3' hidroxil del primer, lográndose así sintetizar fragmentos de DNA. La forma en que hibridizan los dos primers a la doble cadena del DNA, permite que la extensión se realice hacia la región de DNA que esta entre los primers ( Messner y col., 1994).

De la muestra del DNA original se sintetizan fragmentos largos, que cuando cada uno de ellos hibridizan con un primer en el siguiente ciclo, originan fragmentos más cortos, los que a su vez actúan también como moldes produciéndose más fragmentos cortos. En ciclos subsecuentes estos fragmentos se acumulan exponencialmente originando millones de copias. Los fragmentos producidos en la amplificación son detectados como bandas fluorescentes a la luz ultravioleta en un gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio ( Bej y col., 1991 ).

La primera técnica de amplificación que se desarrolló fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa, comúnmente conocida por sus siglas en inglés PCR ( Polymerase Chain Reaction). Con el invento de esta técnica por el científico californiano Kary Mullis en 1984, se revolucionó el mundo de la investigación genética, mérito que le fue reconocido cuando se le otorgó el Premio Nobel en Química en diciembre de 1993 ( Lorente y Lorente, 1995 ).

La PCR es una técnica que permite amplificar (copiar o multiplicar) un trozo o fragmento del DNA en un número infinito de veces ( en la práctica, hasta que haya cantidad suficiente del DNA para poder ser analizado o detectado) al aplicar los pasos consecutivos de desnaturalización, hibridación y extensión, utilizando 2 primers diferentes, los cuales son seleccionados y sintetizados para que solo hibriden a la región específica del DNA que se

quiere amplificar, para ello la secuencia de nucleótidos de dicha región debe conocerse previamente ( Messner y col., 1994 ).

A partir de la PCR se han derivado una serie de técnicas que de manera rápida y simple revelan secuencias del DNA polimórficas, una de estas técnicas es el RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ) .

## ***6. GENERALIDADES DE LA TÉCNICA RAPD.***

La técnica RAPD desarrollada por J. Williams y colaboradores en 1990, está basada en la amplificación por PCR de segmentos al azar del DNA a partir de un sólo oligonucleótido (primer) de secuencia arbitraria de 9 o 10 nucleótidos de largo, con un contenido de G-C de 50- 80 % sin secuencias palindrómicas ( Arias y col., 1998).

El pequeño tamaño de los primers permite aumentar la probabilidad de que exista en el genoma de interés dos sitios de hibridación en orientación inversa, separados por una distancia amplificable de 100 a 3,000 pares de bases. Los sitios de hibridación de los primers son aleatorios a lo largo del genoma por lo que se amplifican simultáneamente muchas regiones distintas del DNA produciéndose fragmentos de diferentes tamaños (Tingey and Tufo, 1993).

Al ser analizados por electroforesis los diferentes fragmentos de amplificación generan un patrón de bandas sobre el gel. La mayoría de las bandas son idénticas entre individuos o especies, pero a veces algunas bandas pueden estar presentes en unos y ausentes en otros revelando polimorfismo o variaciones entre ellos. Un fragmento amplificado en un individuo y ausente en otro constituye un marcador RAPD (Williams y col., 1990).

El polimorfismo observado después de las amplificaciones del DNA genómico, puede deberse a cambios que resulta en la presencia o ausencia de un fragmento RAPD particular, los cuales pueden darse por:

- Cambios de nucleótidos que impiden la amplificación por la introducción de una alteración en el sitio de unión del primer.
- Delección que modifica o elimina el sitio de unión del primer.
- Inserciones que aumentan demasiado la distancia entre los sitios de unión de los primers no permitiendo así la amplificación.
- Inserciones o deleciones que cambien el tamaño del fragmento amplificado (Arias y col., 1998).

Estos tipos de polimorfismos han hecho muy popular a los marcadores RAPDs, por su simplicidad y aplicabilidad a cualquier genoma, ya que desde 1990 que se desarrolló el RAPD ha sido utilizado en el DNA genómico de varias especies distintas como: *Homo sapiens*, *Glycine soja*, *Zea mays*, *Neurospora crassa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, etc.(Williams y col., 1990 ). Una revisión de literatura reveló cerca de 3000 referencias de RAPD ( Caetano-Anollés and Gresshoff, 1998 ).

La técnica RAPD constituye una herramienta muy útil de la Biología Molecular debido a que es muy utilizada en la actualidad para detectar diferencias genéticas entre individuos de manera muy sencilla y sin consumir mucho tiempo, por lo tanto su uso mas frecuente ha sido el encontrar polimorfismos que sean usados como marcadores moleculares en estudios de poblaciones de una amplia variedad de organismos. En este contexto el método es aplicable a Epidemiología Clínica como por ejemplo: Welsh y col., (1992) subdividieron dentro de diferentes especies a *Borrelia burgdorferi*, la causante de la enfermedad de Lyme en humano. Asikainen y col., (1995) , encontraron relaciones entre enfermedades peridontales y variantes genéticas de *Actinobacillus sp.* Similarmente Beingen y col., (1993), definieron la variabilidad genética de *Pseudomonas cepacia* en pacientes con fibrosis quística y así una gran cantidad de artículos en este campo han aparecido en los últimos años ( Caetano-Anollés and Gresshoff, 1998 ).

Sin embargo, los RAPDs presentan una serie de inconvenientes : tienen una herencia dominante que hace que los heterocigotos sean indistinguibles de los homocigotos y, por lo tanto, no proporcionan directamente información alélica. Bandas que coemigran en los geles

pueden no ser homólogas lo que confundiría la interpretación fenotípica de las mismas. Pueden presentarse problemas de reproducibilidad entre los laboratorios debido a las diferencias en la concentración de los componentes en la mezcla de reacción, polimerasa y termociclador empleado. Además la presencia de baja intensidad puede llevar a cometer errores de lectura en los perfiles de bandas (Díaz, 2001).

Debido a las múltiples aplicaciones de la técnica RAPD, no existe un protocolo que sea óptimo para todos los casos. Por lo tanto en los experimentos RAPDs para asegurar la reproductibilidad de los patrones de bandas es indispensable la estandarización de todos los parámetros o condiciones de amplificación.

### ***7. ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN RAPD (en 25 $\mu$ l de reacción).***

**DNA:** Se ha logrado la amplificación de fragmentos del DNA a partir de una gran variedad de especies. Para obtener en el gel de electroforesis bandas fuertes y reproducibles es importante usar concentraciones adecuadas del DNA, pues concentraciones bajas resultan en patrones RAPDs no reproducibles y una excesiva cantidad del DNA genera bandas de pobre resolución (bandas no claramente definidas) (Bej y col., 1991). Por lo que usualmente es recomendable de 5 a 25 ng de DNA (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1998).

**Primer:** Los primers son oligonucleótidos formados por un fragmento de cadena simple del DNA, de unos 10 a 20 nucleótidos de largo, en el caso del RAPD se usan primers de unos 10 nucleótidos. La mayoría de los primers obtenidos comercialmente es de calidad satisfactoria la que puede ir deteriorándose si el primer almacenado es descongelado con frecuencia. (Caetano- Anollés and Gresshoff, 1998). Algunos inconvenientes pueden deberse más a una concentración muy pobre o muy alta del primer; a concentraciones bajas virtualmente no ocurre amplificación y a altas concentraciones hay más amplificaciones de fragmentos cortos, por lo tanto variando la concentración del primer se afecta la producción de fragmentos (Bej y col., 1991). La concentración de primer que usualmente se requiere en la mezcla de reacción está entre el rango de 0.1 y 0.5  $\mu$ M (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1998).

**DNA polimerasa:** son enzimas capaces de soportar altas temperaturas de hasta 95 °C necesarias para separar la doble cadena del DNA sin inactivarse enzimáticamente (termoestable). Estas enzimas realizan la elongación del primer pues son enzimas que en la células catalizan la unión al grupo OH-3' del extremo del primer con el grupo fosfato del desoxirribonucleósido trifosfato a incorporar a través de una unión fosfodiéster, a una velocidad de 60 a 120 nucleótidos por segundo y a una temperatura óptima de 72 °C. La concentración óptima de enzima recomendada para la mezcla es de 1 a 4 Unidades. Cuando la enzima se encuentra a muy bajas concentraciones no se aprecian productos de amplificación en el gel, mientras que altas concentraciones se producen patrones de bandas no bien definidos (Bej y col., 1991).

Debido a que la enzima esta alicuotada en un buffer 50 % de glicerol, es muy común arrastrar ésta por fuera del tips durante el pipeteo de la misma, por ello es conveniente agregar el total de enzima a usar en la mezcla de reacción, en lugar de hacerlo de forma individual tubo a tubo ( Arias y col., 1998).

La enzima Taq polimerasa fue la primera y la más ampliamente utilizada para las reacciones de amplificación (en la utilización de esta enzima se basó el gran descubrimiento de Kary Mullis). Es una DNA polimerasa de bacteria termófilas (*Thermus aquaticus*) que habitan en aguas termales. En la actualidad existen varias empresas que comercializan Taq polimerasa bajo licencia y a su vez distintas variedades de polimerasas termoestables de acuerdo con su utilización. Algunas son naturales y otras son proteínas recombinantes modificadas o no (Arias y col., 1999).

Anteriormente a la utilización por Kary Mullis de la Taq polimerasa se utilizaba las técnicas de amplificación, pero agregando ciclo a ciclo en la mezcla de reacción el fragmento termosensible Klenow de *Escherichia coli*, debido a que durante el calentamiento a 95 °C la enzima se degradaba, este proceso era muy complicado y de difícil ejecución (Arias y col., 1998 ).

**dNTPs:** Los desoxirribonucleósidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) son añadidos a la concentración de 50 a 200 mM de cada uno. Es importante que exista una cantidad equimolar de cada uno de ellos para prevenir incorporación equivocada de los mismos. Con estas concentraciones se tienen suficientes precursores para la síntesis de fragmentos del DNA. Altas concentraciones de dNTPs pueden promover malas incorporaciones por la DNA polimerasa, a bajas concentraciones se disminuye la intensidad de las bandas en el gel (Bej y col., 1991).

**Buffer:** Inicialmente para las reacciones de amplificación se utilizaba un buffer estándar conteniendo 50 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl (pH-8.3), 1.5 mM de  $MgCl_2$  y 100  $\mu g/ml$  de gelatina, pero debido a que se determinó que en algunas circunstancias era necesario variar la concentración de  $MgCl_2$  en la mezcla de reacción, actualmente se comercializa por aparte el buffer y la solución de  $MgCl_2$  (Arias y col., 1998).

**Magnesio:** La concentración de magnesio (cofactor de las enzimas DNA polimerasas), es uno de los factores más importantes que pueden afectar el comportamiento de la DNA polimerasa durante la reacción. Una inadecuada concentración puede llegar a inactivar a la polimerasa. Inversamente un exceso de magnesio reduce la fidelidad de la polimerización de la enzima. Por lo tanto, la concentración de magnesio en la reacción de amplificación debe llevarse cuidadosamente a un nivel óptimo, el cual puede determinarse empíricamente al realizar una serie de ensayos RAPDs con  $MgCl_2$  en un rango de 1 a 4 mM. El EDTA del buffer TE en que suele diluirse los DNAs, puede actuar como agente quelante del magnesio afectando la concentración de magnesio libre, por lo que debe vigilarse a la vez la cantidad de EDTA en la reacción (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1998).

**Termociclador:** Las amplificaciones RAPDs son muy sensibles al perfil térmico del termociclador; diferentes termocicladores tienen distintos perfiles térmicos, aún cuando están programados a ejecutar ciclos de temperaturas idénticos, por lo tanto, los patrones de bandas sólo son reproducibles en máquinas de la misma casa comercial o diferentes máquinas cuyos perfiles térmicos son al menos aproximadamente iguales. Lo más recomendable en estos casos

para asegurar la reproducibilidad de los patrones RAPDs es realizar los ensayos en el mismo termociclador (Caetano-Anollés and Gresshoff, 1998).

**Ciclos de temperatura y tiempo:** De manera general en las reacciones de amplificación, una vez que la mezcla de reacción este preparada se coloca en el termociclador, donde el aparato primero debe ejecutar un período de calentamiento previo a 95 °C durante 2-5 min para asegurar la total separación de las cadenas del DNA, y luego entrar a los 25 a 45 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación (Arias y col., 1998).

La temperatura de desnaturalización debe permitir una completa separación de las cadenas del DNA, pues calentamientos insuficientes durante el paso de desnaturalización causan fallas en los resultados de amplificación (Bej y col., 1991). El tiempo y la temperatura de desnaturalización en cada ciclo son normalmente de 30-60 seg y 95 °C (Arias y col., 1998). Las temperaturas más críticas son las de hibridación y elongación, así como el tiempo de cada una de ellas, factores que deben ser optimizados para evitar hibridaciones con apareamientos imperfectos que conducen a una extensión de fragmentos no específicos (Bej y col., 1991).

Para lograr la hibridación *in vitro* es necesario bajar la temperatura (que había sido previamente elevada a 95 °C) hasta llegar a la temperatura óptima de hibridación del primer con la cadena molde. Esta temperatura depende del largo y la composición de bases del primer y el tiempo entre 30 seg a 1 min La etapa de extensión o síntesis de la nueva cadena del DNA ocurre a 72 °C (temperatura óptima de polimerización de la enzima Taq polimerasa) durante un período de tiempo de 30 seg a 2 min , dependiendo del largo de la cadena a amplificar. Una vez finalizada la etapa de ciclado se somete los tubos a una etapa de 72 °C durante 5-8 min , con la finalidad de que se terminen de polimerizar aquellas cadenas que por alguna razón no se han completado cuando correspondía ( Arias y col., 1998).

Como se explicó anteriormente, en un comienzo la reacciones de amplificación se lograba con el agregado a la mezcla de reacción del fragmento termosensible Klenow de *Escherichia coli* en cada nuevo ciclo debido a que se degradaba durante el calentamiento a 95 °C. Posteriormente con el aislamiento de la enzima termoestable de la bacteria *Thermus*

*aquaticus* se pudo automatizar la amplificación *in vitro* del DNA en los termocicladores, donde al realizar la polimerización a 72 °C permitió utilizar temperaturas de hibridación más altas, logrando eliminar amplificaciones no deseadas producto de hibridaciones no específicas de los primers a baja temperatura de polimerización (37 °C) de la enzima de *E. coli*. El desarrollo de esta tecnología permitió contar con un nuevo grupo de marcadores moleculares para comparar organismos a nivel del DNA (Arias y col., 1998).

**Aceite mineral:** Para la amplificación es recomendable añadir 80 a 100 µl de aceite mineral sobre la mezcla de reacción, para evitar la evaporización de los líquidos particularmente en el paso de desnaturalización, además mantienen estable el calor y las concentraciones de sales a través de la mezcla de reacción (Bej y col., 1991). Hoy en día las marcas comerciales de termocicladores poseen modelos denominados Hot-Bonnet, que incluyen una tapa metálica que cubre por sobre la tapa de los tubos y se calienta hasta 100°C impidiendo la evaporización y el consiguiente cambio de volumen sin necesidad de usar aceite mineral (Arias y col., 1998).

**Prevención de contaminaciones:** Cantidades de hasta fentogramos de un plásmido pueden ser amplificados, por lo tanto, es importante evitar las contaminaciones. Para prevenirlas es conveniente tener juegos de micropipetas para uso general del laboratorio y otro para pipetear las reacciones de amplificación. O de lo contrario usar tips con filtros que previene los aerosoles que se producen en la superficie interior del líquido dentro del tips. Usar guantes descartables para evitar contaminar con las células epiteliales que se nos descaman a diario, y así evitar las nucleasas de nuestras células (Arias y col., 1998).

## **8. GENERALIDADES DE LAS EXTRACCIONES DEL DNA.**

El primero y más importante paso para realizar estudios a nivel molecular es sin lugar a duda la extracción del DNA. El DNA en procariotas es de doble cadena y circular y se encuentra a través del citoplasma. En eucariotas el DNA es localizado en el núcleo, en las

mitocondrias y cloroplastos. El DNA del núcleo es de doble cadena lineal, en cambio el DNA de mitocondrias y cloroplastos es parecido al DNA de procariotas, doble cadena y circular. El DNA de procariotas es relativamente libre de proteínas asociadas, pero el DNA en el núcleo de eucariotas está asociado con proteínas básicas llamadas histonas. Moléculas contaminantes que deben ser eliminadas del DNA tanto de procariotas como de eucariotas son las proteínas y el RNA. Las proteínas son desnaturalizadas por la adición de solventes orgánicos y detergentes, y el RNA es eliminado con un tratamiento con RNasa (Robyt and White, 1987).

Actualmente los procedimientos de extracción del DNA se han optimizado para muchos organismos llegando a simplificarse tanto, que son fáciles de usar y requieren mínimas cantidades de tiempo sin sacrificar la calidad. En cualquier tipo de procedimiento que se utilice para la extracción del DNA, se aplican los siguientes pasos generales: (Berríos, 1994)

- Lisis o ruptura de la membrana celular, dejando el material en un buffer de extracción de 50 a 65 °C por 10 min o más, lo que permite liberar los componentes celulares en la solución. Este buffer generalmente contiene SDS o CTAB (destruyen la membrana, disocian proteínas y polisacáridos), agentes quelantes como el EDTA (remueven iones metálicos requeridos para la actividad de las nucleasas), NaCl (disocia proteínas del DNA) y Tris (evita los cambios de pH).
- Sedimentación de proteínas y restos celulares por centrifugación para su eliminación.
- Concentración y precipitación del DNA en la fase acuosa, con alcoholes como etanol o isopropanol, los que a la vez remueven sales y otros contaminantes.
- Sedimentación del DNA por centrifugación para su obtención.
- Conservación del DNA en un buffer TE (Tris-EDTA) a -20 °C.

Según la calidad de DNA requerida pueden o no adicionarse pasos para la purificación del mismo por desproteinización con enzimas proteolíticas como proteinasa K, así como también con fenol y/o cloroformo. Además se puede purificar en gradiente de cloruro de cesio (Berríos, 1994).

Para comprobar la calidad y cantidad del DNA extraído es conveniente hacer un gel de agarosa al 0.8-1 % con bromuro de etidio y correr muestras de la extracción a voltaje constante. Luego debe ser observado bajo la luz UV (260 nm). El bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA y florece a esa longitud de onda. Si el DNA extraído es de alto peso molecular migrará poco en el gel en cambio si está degradado, se podrá observar un chorreado a lo largo del carril (Arias y col., 1998).

La cuantificación del DNA extraído, se puede realizar de varias formas:

- Agregar en el gel de verificación en alguna calle contigua, estándares de peso molecular conocido para cuantificar los DNA extraídos.
- Existen aparatos diseñados para leer cantidades de fluorógeno que se intercala entre las bases del DNA. El valor leído se intercala sobre una curva de calibración previa, y de ahí se extrapola la concentración de las muestras.
- Se pueden realizar lecturas de absorbancia de espectrofotómetro de luz UV a 260 nm de longitud de onda. Se sabe que 1 DO equivale a 50 µg/ml.
- Realizar una serie de diluciones con un estándar del DNA comercial de concentración conocida, agregarle bromuro de etidio y observar toda la serie de diluciones a la luz UV en forma conjunta con los DNA incógnitas. De este modo uno puede tomar una idea del orden de magnitud de la concentración de los DNA extraídos (Arias y col., 1998).

## ***9. INFECCIONES POR *L. chagasi* EN NICARAGUA.***

Leishmaniasis es considerada una de las 6 enfermedades más importantes a nivel mundial. Se reportan incrementos notables del número de casos en 88 países de Asia, Africa, Europa Mediterránea y América donde se manifiesta en forma epidémica en zonas tropicales y subtropicales. En 1993 la Organización Mundial de la Salud estima que existe una población en riesgo de 350 millones de personas, con una prevalencia global de 12

millones de casos y 500 mil nuevos casos cada año, representando por lo tanto esta enfermedad un problema de salud pública ( Herwaldt, 1999 ).

Cada uno de los tipos de leishmaniasis: cutánea, mucocutánea y visceral producidas tanto en el Nuevo Mundo como en el Viejo Mundo, son causadas por una o varias especies distintas de *Leishmania* o variantes de una determinada especie, haciendo de la leishmaniasis no una simple enfermedad sino una colección de enfermedades donde cada especie de *Leishmania* tiene su propio potencial de causar un conjunto característico de síntomas en el hombre, constituyendo así un problema complejo difícil de manejar (Páiz y Sandoval, 2000).

Excepto por pequeñas diferencias en el tamaño todas las especies de *Leishmania* son morfológicamente similares. Los criterios iniciales para la identificación y clasificación de estos parásitos han sido basados sobre las características extrínsecas tales como: manifestaciones clínica, geográficas y rasgos epidemiológicos y una variedad de otros criterios biológicos. Luego se dio el desarrollo de métodos bioquímicos y moleculares que proveen marcadores más precisos basados en características intrínsecas del parásito. Entre las técnicas mas frecuentemente usadas para caracterización de *Leishmania* están la electroforesis de isoenzimas y pruebas de DNA basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction) ( Cupolillo y col.,1998 ).

Desde los años de 1980 se han presentado en Nicaragua casos de leishmaniasis visceral y a partir de 1997 se han reportado casos de una forma cutánea atípica además de casos de visceral en el occidente del país, en donde ambos tipos de leishmaniasis es producida por *L. chagasi*. Estudios de caracterización con PCR-Esquizodemos realizados por el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) del Ministerio de Salud (MINSAL), no encontró variación genética entre los parásitos aislados de enfermos con la forma cutánea atípica y visceral ( Belli y col., 1999). Pero el hecho de que las dos formas de leishmaniasis presentan manifestaciones clínicas tan diferentes, hace pensar que ambos casos deben de tratarse de variantes de *L. chagasi* y no del mismo parásito, por lo que se debe continuar los análisis en busca de estos marcadores.

Por lo tanto ante el interés de detectar estas variaciones a nivel de genoma, surge el presente trabajo de investigación en el cual se pretende aplicar la técnica basada en PCR denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) al DNA de parásitos de leishmania cutánea atípica y visceral. La ventaja del RAPD es que a diferencia del PCR, utiliza primers cortos de secuencia arbitraria lo que permite detectar al azar diferentes sitios a lo largo del genoma, incrementando así la posibilidad de detectar polimorfismo que permitan caracterizar un genotipo determinado (Williams y col., 1990).

La identificación de los genotipos de *Leishmania* a través de la caracterización genética es de suma importancia por razones clínica y epidemiológica, ya que es un factor que ayuda a relacionar los tipos genéticos con las manifestaciones clínicas de la enfermedad y por lo tanto con el tratamiento adecuado que se deba administrar. Además permite confirmar al agente etiológico y su distribución en una determinada área endémica, lo cual es crítico para el diseño de medidas apropiadas en el control de la *Leishmania*.

***OBJETIVOS***

## **OBJETIVO GENERAL:**

Detectar posibles variaciones genómicas entre parásitos de *Leishmania chagasi* aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea atípica y visceral con la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Aislar los parásitos causantes de la leishmaniasis visceral y cutánea atípica en medios de cultivos.
2. Establecer un protocolo adecuado para la extracción del DNA de parásitos de especies de *Leishmania*.
3. Determinar las condiciones óptimas para las de amplificaciones RAPDs en el DNA extraído de las cepas de *Leishmania chagasi* (cutánea atípica y visceral).
4. Detectar con los análisis RAPDs los primers que puedan generar posibles polimorfismo para caracterizar con ellos a las variantes de *Leishmania chagasi*.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAN-León. Según los objetivos planteados en este tipo de Investigación Básica, para detectar variaciones genéticas entre los parásitos *L. chagasi* causantes de la leishmaniasis visceral y cutánea atípica, se tenía que aislar en medio de cultivos dichos parásitos, extraerles luego el DNA y finalmente evaluar sus DNAs con la técnica RAPD previamente estandarizada, basándose todo esto en los procedimientos que a continuación se describen.

## ***1. AISLAMIENTO DE LOS PARÁSITOS DE L. chagasi.***

### ***1.1. TOMA DE MUESTRA.***

La toma de muestra para conseguir los aislados de *L. chagasi* causantes de leishmaniasis visceral y cutánea atípica se hace de la siguiente manera:

**Visceral.** A un paciente hospitalizado en el HEODRA ((Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales) de la ciudad de León, con signos y síntomas compatibles con leishmaniasis visceral el médico pediatra le realiza una punción de médula ósea.

La muestra obtenida, sin anticoagulante, es inoculada asépticamente para ser incubada a 27 ° C en los tubos con medio bifásico 3N Normal por 15 días, para luego transferir gotas de este cultivo a nuevos tubos con medio bifásico 3N Modificado donde los parásitos son mantenidos vivos por repiques semanales, a la vez que el medio es revisado al microscopio para constatar el crecimiento de los parásitos.

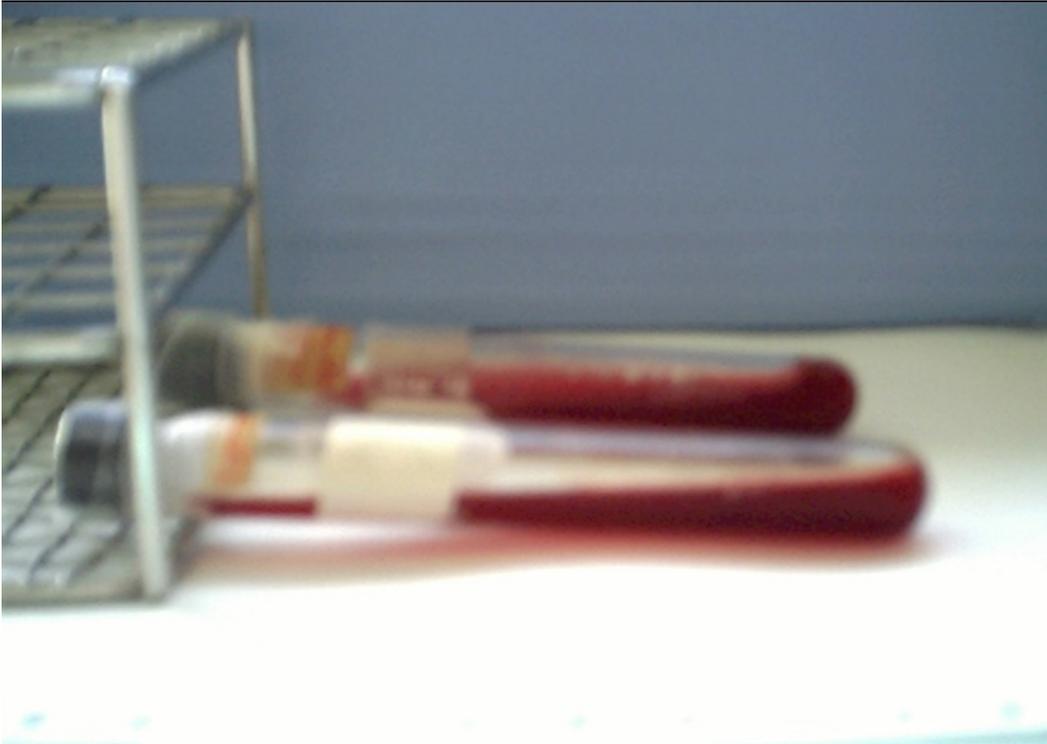
**Cutánea Atípica.** La muestra se obtiene haciendo una biopsia de piel (por especialista) en los nódulos que se producen en la piel de los pacientes, los cuales son provenientes de la comunidad de Troilo ubicada a 10 Km. al sudoeste de la ciudad de León que es el sitio en donde se reportan mayor cantidad de casos en el occidente del país. El procedimiento para realizar este aislado es el siguiente:

- Hacer asepsia en el borde de la lesión con alcohol al 70%.
- Inyectar 1cc de xilocaina subcutáneamente en el sitio donde se va a tomar la biopsia.
- Insertar el sacabocados haciendo movimientos rotatorios para que corte la dermis, si no se dispone de sacabocados con un bisturí se hace un corte en forma triangular de aproximadamente 3mm de lado que incluya la dermis.
- Al lado del mechero se deposita la biopsia en un frasco que contenga PBS con penicilina a 10,000 UI/ml.
- Guardar en refrigeración ( 4°C) durante 2 horas para que la penicilina elimine la flora bacteriana restante.
- En forma aséptica cambiar el PBS y guardar de nuevo la biopsia en el refrigerador hasta el día siguiente.
- Colocar el tejido en un triturador estéril y después de triturar el tejido se introduce con pipeta pasteur la suspensión obtenida a los tubos con medio bifásico 3N Normal para incubar por 15 días a 27 °C.
- Transferir gotas del cultivo a los tubos con medio bifásico 3N Modificado para el mantenimiento semanal de los parásitos en este medios a 27 °C.
- Revisar el medio al microscopio para constatar el crecimiento de los parásitos.

## ***1.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO LÍQUIDO.***

Tanto el medio 3N Normal como el Modificado utilizan la misma fase líquida la cual se prepara mezclando en 1000 ml de agua destilada, 10 g de glucosa y 8.5 g de NaCl. Se esteriliza por autoclave y mientras no sean añadidos a los tubos pueden conservarse en refrigeración, pues se debe agregar el medio líquido recién suplementado con penicilina a 2.000 UI /ml (de 3 a 4 ml) hasta momentos antes de ponerlo en los tubos que ya contienen el medio sólido de forma inclinada, para hacerle a este nuevo medio un pase de gotas (de 1 a 3 gotas por ml de medio líquido) de un cultivo con crecimiento de parásitos.

### **1.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO SÓLIDO (1000 ml).**



**Foto 3. Tubos en posición inclinada mientras se solidifica el agar con sangre de conejo, en la preparación de la fase sólida del medio bifásico.**

#### **1.3.1. 3N Normal.**

- Mezclar en agua destilada el agar-agar y NaCl . Calentar en cocina hasta que se funda el agar.
- Distribuir 3.5ml en cada tubo de 10 ml antes de que solidifique el agar y esterilizar por autoclave.
- Adicionar a cada tubo junto a un mechero, cuando el medio esterilizado tenga una temperatura aproximada de 60 °C, sangre de conejo citratada suplementada con 4000 UI/ml (para cada 20 ml de sangre 2ml de citrato trisódico 10% estéril).
- Mezclar bien mediante movimientos rotatorios y suaves para dejar enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada .
- Conservar en refrigeración por un período no mayor de 3 meses.

Para preparar 1000 ml de este medio las cantidades necesarias a mezclar son:

Agar-agar.....	15 g.
NaCl.....	6 g.
Agua destilada.....	875ml.
Sangre citrada.....	125ml.

### ***1.3.2. 3N Modificado.***

- Añadir al agar base sangre el agua destilada y calentar en cocina hasta que se funda el agar.
- Distribuir 3.5 ml en tubos de 10 ml y autoclavar .
- Enfriar el agar a aproximadamente 60 °C para añadir la sangre de conejo desfibrinada suplementada a 4000 UI/ml.
- Mezclar bien mediante movimientos rotatorios y suaves.
- Dejar enfriar en forma inclinada hasta que solidifique el agar.
- Conservar en refrigeración por un período no mayor de 3 meses.

Para preparar 1000 ml de este medio las cantidades necesarias a mezclar son:

Agar base sangre.....	40 g.
Agua destilada.....	800ml.
Sangre desfibrinada.....	200ml.

La sangre de conejo desfibrinada utilizada en este medio sólido se prepara en condiciones de esterilidad, realizando lo siguientes pasos:

- Recoger en un erlenmeyer con perlas de vidrio, aproximadamente 20 ml de sangre de la oreja de un conejo.
- Agitar suavemente con movimientos circulares suaves y continuos durante 10 min para desfibrinar la sangre y evitar que se coagule.
- Pasar a un frasco la sangre y suplementarla con 4000 UI/ml.
- Hemolizar la sangre añadiendo un volumen de agua destilada estéril que este a temperatura ambiente.
- Agitar por inversión durante 15 min.

- Centrifugar 15 min a 3000 rpm a temperatura ambiente.
- Recoger en un frasco el sobrenadante para conservarlo en refrigeración hasta el momento en que se añada al agar.

## **2. EXTRACCIÓN DEL DNA.**

El procedimiento que a continuación se describe se tomó como base para poner a punto un protocolo de extracción de DNA de cepas de *Leishmania* a partir de cierta cantidad de sedimento de parásitos obtenidos por centrifugación, para evitar tener que hacer un conteo de células a como lo indica el procedimiento base, en donde, si no se llega a la cantidad de células esperadas en el cultivo no se puede iniciar la extracción. Además se pretendía modificar las cantidades indicadas en mililitros (ml) a microlitros ( $\mu$ l) y así poder realizar el protocolo de extracción en tubos Eppendorf en microcentrífuga disminuyendo así las cantidades de soluciones utilizadas en la extracción lo que produce un ahorro sustancial de dichas soluciones.

### **2.1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL DNA DE CÉLULAS.**

Este procedimiento enviado del Departamento de Bioquímica y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares, describe el aislamiento de DNA partiendo de  $10^{10}$  células. Para un número distinto han de reajustarse los volúmenes.

1. Centrifugar las células a 4.000 rpm por 10 min.
2. Resuspender el sedimento en 5 ml de PBS y volver a centrifugar como en 1.
3. Resuspender el sedimento en 8.5 ml de una solución que contenga 0.15 M de NaCl y 0.1M de EDTA (en frío).
4. Añadir proteinasa K hasta una concentración final de 0.1 mg/ml, SDS 0.5 % final.
5. Incubar a 50 °C durante 30 min.
6. Añadir un volumen de fenol precalentado a 60 °C, mezclar bien.
7. Centrifugar durante 10 min a 8.000 rpm a 4 °C.

8. Recoger la fase acuosa y extraer con un volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1), mezclar bien.
9. Igual que 7.
10. Extraer la fase acuosa.
11. Añadir un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (24:1), mezclar.
12. Igual que 7.
13. Extraer la fase acuosa.
14. Añadir 0.1 volumen de acetato sódico 3 M y 2.5 volumen de etanol frío.
15. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo hasta que la madeja formada por el DNA se haga evidente.
16. Recoger la madeja con una pipeta Pasteur (a la que se le ha cerrado la punta a la llama) y llevarla a una solución de etanol al 80 %.
17. Dejar secar para evaporar el etanol pero sin llegar a dejar que se seque por completo.
18. Resuspender en 0.5 ml de TE.
19. Añadir RNasa hasta una concentración final de 20 ug/ml. Incubar durante 30 min a 37 °C.
20. Extraer con un volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1). Mezclar.
21. Microfugar durante 3 min.
22. Igual que 14.
23. Dejar durante 5 min en hielo.
24. Microfugar durante 10 min.
25. Lavar con etanol al 80 %.
26. Resuspender en 0.5 ml de TE.
27. Distribuir en alícuotas y guardar a -20 °C.

## ***2.2. CHEQUEO, CUANTIFICACIÓN Y DILUCIÓN DEL DNA.***

Mediante electroforesis en un mini gel de agarosa 0.8 a 1 % se chequea y cuantifica una muestra de 10 µl del DNA extraído que va mezclada con 1 a 2 µl de azul de bromofenol (EDTA 10 mM, glicerol 20 % y azul de bromofenol 0.25 %). Para ello se realiza lo siguiente: Fundir por ebullición la agarosa diluida en buffer TBE 1X (Tris 0.445 M, ácido bórico 0.445 M y EDTA 0.01M) y cuando enfríe aproximadamente a 40 °C agregarle bromuro

de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Dejar solidificando el gel a temperatura ambiente en una cubeta con peines para la formación de pozos. Retirar los peines y colocar el gel dentro de la cámara de electroforesis que contiene buffer TBE 1X. Depositar en los pozos las muestras de DNA a chequear, con un marcador de DNA de concentración conocida, que permitan cuantificar por estimación de la intensidad de fluorescencia la concentración de las muestras obtenidas en la extracción, cuando se visualice la presencia de DNA en lámpara UV (260nm), después de hacerlas migrar a 5 V/cm (Williams y Ramos, 2000).

Una vez determinada la concentración del DNA obtenido de la extracción, se diluye a una concentración final de 5 a 25 ng/µl. Los 100 µl preparados de esta dilución son separados en alícuotas de 50 µl y almacenados a -20 °C para conservar en buen estado las muestras que serán utilizadas en las amplificaciones de DNA (Williams y Ramos, 2000).

### ***3. AMPLIFICACIONES DEL DNA POR LA TÉCNICA RAPD.***

Las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción, así como las temperaturas y tiempos de los procesos de amplificación deben ser previamente estandarizados para amplificar por RAPD los DNAs de *L. chagasi*.

#### ***3.1. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN.***

Se prepara una mezcla que contiene todos los componentes para realizar las reacciones de amplificación del DNA en un volumen final de 25 µl. Hay que optimizar las concentraciones finales de cada componente tomando como referencia lo siguiente:

<u>Componentes</u>	<u>Concentración final</u>
Agua estéril	Volumen necesario para completar 25 µl
Buffer PCR 10X II	1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.30 y 50 mM KCl)
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 a 4 mM
dNTP	50 a 200µM de c/dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Primer	0.1 a 0.5 µM
<i>Taq</i> polimerasa	1 a 4 U
DNA	5 a 25 ng

Según el número de muestras a utilizar se prepara primero el volumen total de todos los componentes de la mezcla de reacción, sin DNA y luego se añade esta mezcla y el DNA (hasta completar el volumen final de 25  $\mu$ l) en un mini tubo Eppendorf 0.2 ml. Colocar una gota de aceite mineral sobre la mezcla, para evitar la evaporación de las muestras cuando sean sometidas a altas temperaturas durante la amplificación.

### **3.2..PROCESOS DE AMPLIFICACIÓN RAPD.**

Se coloca la mezcla de reacción en un termociclador, el cual esta programado con diferentes temperaturas y tiempos, de las cuales hay que probar cuales son las óptimas para conseguir excelente resultados en la amplificación de fragmentos del DNA de *Leishmania*. Estas temperaturas y tiempos pueden ser:

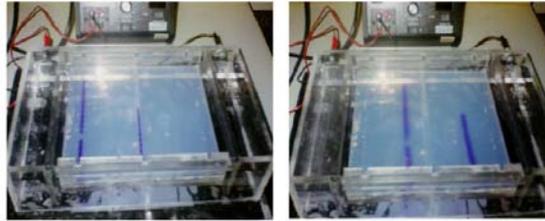
- Desnaturalización inicial: 3 a 5 min a 95 °C.
- Repetición de 45 ciclos, donde en cada uno ocurre:
  - Desnaturalización: 30 a 60 seg a 95 °C.
  - Hibridación del primer: 30 seg a 1 min a 40-60 °C.
  - Elongación: 30 seg a 2 min a 72 °C.
- Elongación final: 5 a 8 min 72 °C.

Finalmente las muestra se conservan por tiempo indefinido a 4 °C, mientras no sean retiradas del termociclador

### **3.3.CHEQUEO DE LA AMPLIFICACION..**

Al finalizar la amplificación, se añade 5  $\mu$ l de azul de bromofenol 20% a los 25  $\mu$ l de mezcla de reacción. Extraer toda la muestra evitando tomar el aceite que está por encima, para depositarla en un gel de agarosa 1.4 % sumergido en buffer TBE 1X (preparado igual que el gel de agarosa 0.8 % ) (Williams y Ramos, 2000).

Depositar también en el gel un marcador de DNA cortado con alguna restrictasa en bandas de peso molecular conocido, que permite reconocer la posición de las bandas generadas en la amplificación. Después de la migración por electroforesis a 5 V/cm se visualizan los fragmentos amplificados sobre la lámpara UV (260nm) (Williams y Ramos, 2000).



**Foto 4. Electroforesis en gel de agarosa.**

Los primers son los que varían en cada prueba RAPD, así que una vez estandarizadas las condiciones de amplificación se ensayarían unos 30 primers distintos de unos 10 nucleótidos de largo de secuencia arbitraria, para buscar las posibles variaciones entre parásitos de *L. chagasi* causantes de leishmaniasis visceral y cutánea atípica.

## ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

Esta investigación fue propuesta con la finalidad de determinar a nivel del DNA si las enfermedades de leishmaniasis visceral y cutánea atípica que se presentan en el occidente del país, son causadas o no por el mismo parásito de *L. chagasi*. El interés de identificar si la forma que causa la leishmaniasis cutánea atípica es una variante de la que causa la visceral, se suscitó ante las manifestaciones clínicas tan distintas que presentan ambos tipos de enfermedad, llegando la primera a ser una enfermedad grave que compromete a varios órganos y en cambio la segunda no presenta ningún malestar sólo la presencia de los nódulos de la piel.

Es bien conocido que los factores de riesgo que están asociados con la leishmaniasis visceral son la edad, estado nutricional y estado inmunológico, ya que las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se presentan principalmente en infantes y niños desnutridos y en adultos con estado inmunológico deteriorado (Bardo y col., 1986). Esta situación podría ser la causante de que *L. chagasi* lograra desarrollar una forma variante, que ha sido capaz de encontrar una nueva forma de infección en el hombre.

Hay estudios que indican que en ocasiones *L. tropica* y *L. mexicana* pueden causar infección visceral en vez de una lesión cutánea (Pearson y col., 1992). Además se ha reportado que *L. infantum* un parásito cercanamente relacionado con *L. chagasi* que afecta en el Litoral Mediterráneo también es causante de leishmaniasis visceral y cutánea atípica y en este caso, se ha encontrado diferencias genéticas por medio de análisis cimodemo (caracterización por electroforesis de izoenzimas) (Belli y col., 1999).

Pruebas a nivel del DNA realizadas entre parásitos aislados de *L. chagasi* en pacientes con leishmaniasis visceral y en pacientes con cutánea atípica en el CNDR (Centro de Diagnóstico y Referencia) del MINSA (Ministerio de Salud) utilizando la técnica molecular PCR- Esquizodemos (donde los productos de la amplificación del DNA del minicírculo es digerida con enzimas de restricción específicas), no encontró diferencias genéticas entre ellos (Belli y col., 1999), pero existen otras técnicas moleculares de mayor utilidad y amplio uso para detectar variabilidad como el RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), razón por la cual se propuso aplicarla en esta investigación, para la

búsqueda de una posible variación que podría existir entre las dos formas de leishmaniasis que se da en el occidente del país.

Se ha reportado que parásitos de *L. chagasi* aislados tanto de pacientes con leishmaniasis visceral como cutánea atípica en Honduras presentan similar PCR-Esquizodemos y patrones RAPDs, y que los patrones de PCR-Esquizodemos de los parásitos de *L. chagasi* de Nicaragua resultaron diferentes a los de Honduras ( Belli y col.,1999). Los análisis PCR-Esquizodemos van dirigidos a una región específica del DNA del minicírculo, en cambio los análisis RAPDs al ensayar primers cortos con secuencia arbitraria se puede tener como resultado que ninguno de los primers probados encuentren polimorfismo entre los genomas analizados, pero como se puede contar con una gran variedad de este tipo de primers, basta con encontrar un primer que detecte variación para determinar que hay diferencias a nivel del DNA entre los individuos analizados.

Debido a que para aplicar la técnica RAPD a los parásitos *Leishmania* se requiere aislar primero a estos parásitos de pacientes infectados, para luego extraerles sus DNAs, es que esta investigación inició con el aislamiento de *L. chagasi* causante de la leishmaniasis visceral, pero cuando a estos parásitos se les aplicó un protocolo de extracción de DNA que previamente ya había sido adaptado en otras cepas de *Leishmania*, no fue posible obtener DNA de los parásitos aislados, por lo que se procedió a hacerle nuevas modificaciones al protocolo e incluso probar otros protocolos de extracción sin lograr obtener DNA, lo que constituyó la causa principal de que esta investigación no avanzara a la siguiente etapa de realización y que por lo tanto no se llegaran a concluir todos los objetivos propuestos. Sin embargo justo antes de presentar este informe, de una de las tanta pruebas ensayadas se logró la extracción del DNA de una muestra de *L. chagasi*.

Por lo anteriormente expuesto es que a continuación se presentan como resultados todo lo realizado para conseguir el aislamiento del parásito causante de leishmaniasis visceral, las diferentes pruebas realizadas y problemas suscitados para extraer su DNA.

### ***1. AISLAMIENTO DE L. chagasi CAUSANTE DE LEISHMANIASIS VICERAL.***

Una publicación hecha por Belli y colaboradores (1999), reporta que los parásitos que causan la leishmaniasis visceral en Nicaragua, son extremadamente fastidiosos y difíciles de crecer en cultivos a diferencia de los parásitos que causan esta misma enfermedad en Honduras los cuales pueden ser aislados rápidamente. Por lo que se pensó al proponer esta investigación, que esta etapa de aislamiento podría ser un factor limitante para su ejecución, pero contrario a lo esperado sí se consiguió el aislamiento de *L. chagasi* causante de la leishmaniasis visceral, aunque con el problema de que no crecían en abundante cantidad, lo que podría ser superado al reunir los sedimentos de parásitos centrifugados en varios tubos hasta obtener la cantidad de sedimento (en gramos) adecuada para iniciar la extracción del DNA.

La muestra de sangre para conseguir este aislado fue tomada por un pediatra, quien realizó una punción de la médula ósea de un paciente de 2 años de edad proveniente del municipio del Viejo, Chinandega, el cual fue trasladado al Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguëllo (HEODRA) de la ciudad de León, presentando posibles síntomas de leishmaniasis visceral. Simultáneamente se hicieron frotis de sangre para ser llevados a examinar al Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAN-León, donde al ser observados los frotis al microscopio no fue identificado en ellos la presencia del parásito y por lo tanto no se pudo en esos momentos confirmar en el paciente la enfermedad ( aunque debido a los síntomas presentados se le empezó a administrar tratamiento ), a pesar de ello se continuó con el proceso de aislamiento en los medios de cultivos, para ver si mas adelante se podía a través del crecimiento de los parásitos de *L. chagasi* confirmar en el paciente el diagnóstico de leishmaniasis visceral.

Así que posteriormente, el hecho de lograr el crecimiento de *L. chagasi* en los medios de cultivos a partir de la muestra de sangre de la médula ósea del paciente con síntomas de leishmaniasis visceral, fue la forma en que se logró diagnosticar como positiva dicha enfermedad.

Esto es concordante con lo referido en la bibliografía, de que el frotis directo constituye un método de diagnóstico de leishmaniasis de forma rápida y de bajo costo. En el caso de leishmaniasis visceral el frotis directo puede tomarse mediante punción-aspirado de la médula ósea, bazo o ganglio linfático. La aspiración esplénica es positiva en más del 80 % y de la médula ósea en un 86 % . Sin embargo la utilización de medios de cultivo artificiales para la multiplicación del parásito es una forma indirecta de gran sensibilidad, disponible también para el diagnóstico de leishmaniasis visceral y leishmaniasis mucocutánea y en la forma cutánea se realiza de forma selectiva. Tradicionalmente el medio mas utilizado para este fin es Novey-Mac Neal-Nicolle (3N). Los cultivos deben mantenerse a temperatura entre 22 a 28 °C durante 21 días buscando la presencia de promastigotes. La prueba suele ser positiva a los 7 días (Páiz y Sandoval, 2000).

Cuando finalmente se consiguió depurar de células sanguíneas del paciente y aislar los parásitos de *L. chagasi* en medios de cultivos 3N Modificado, el cual contiene sangre de conejo desfibrinada y hemolizada, lo que garantiza que los medios queden libres de células sanguíneas provenientes de la sangre del conejo, se decidió pasar a la etapa de extracción del DNA, con la seguridad de que el DNA que se extrajera de esos medios de cultivos serían sólo de los parásitos de *Leishmania* que habían crecido en él.

La manutención de los parásitos *in vitro* implica preparar y esterilizar todos los materiales y soluciones a utilizar, chequear de forma estéril al microscopio previo a realizar los pases, que todos los tubos escogidos para la inoculación a nuevos tubos (los que se vieran a simple vista que no tenían contaminación) estuvieran libre de posibles organismos contaminantes y finalmente esterilizar y lavar todo el material utilizado y desechado para luego volver a prepararlo para los siguientes pases. Todo lo antes expuesto, constituye en nuestras condiciones de laboratorio un trabajo muy laborioso y extenuante que consume gran cantidad de tiempo, debido a eso se decidió mantener sólo este aislado y hasta después de obtener su DNA, se procedería a aislar los parásitos de *L.chagasi* causantes de la leishmaniasis cutánea atípica. Pero por los problemas encontrados en la obtención del DNA y al hecho de tener que realizar el presente informe, quedará para un futuro inmediato la continuación y realización de los otros objetivos propuestos.

## **2. ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA DE LEISHMANIA.**

Uno de los objetivos específicos de este estudio era poder adecuar un protocolo para lograr extraer el DNA de parásitos de *Leishmania*, pero debido al reto que planteaba conseguir aislar a *L. chagasi*, se pensó en adecuar primero un protocolo de extracción de DNA de una cepas de *Leishmania* que crece *in vitro* en el laboratorio en condiciones ya establecidas.

Por lo tanto, para poder realizar dichas pruebas a principios del año 2001, fueron obtenidas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá de Henares, tres cepas de *Leishmania* correspondiente dos de ellas a *L. infantum* (LEM 75 y Laika) y una de *L. panamensis* (Ls94), así como sus respectivos medios para poder mantenerlas vivas por varias semanas; en medio bifásico 3N Modificado para las cepas Ls94 y Laika y medio RPMI para la cepa de LEM 75.

A partir de estas cepas se lograron hacer tres extracciones de DNA a través de las cuales se consiguió adecuar un protocolo que aunque se extrajera poca cantidad de DNA era suficiente para ser utilizado en análisis RAPDs, sin tener que realizar diluciones de ellas. El procedimiento utilizado para realizar estas extracciones del DNA de las cepas de *Leishmania* (LEM 75, Laika y Ls 94), se logró modificando del protocolo base (presentado en la sección de Materiales y Métodos) lo siguiente:

- 1) El usar cantidades en microlitros en vez de mililitros reduciéndose así sustancialmente el gasto de las soluciones necesarias a utilizar en la extracción, y permitiendo esto también poder usar la microcentrifuga con refrigeración con que cuenta el laboratorio (ya que para tubos grandes la centrifuga no tiene sistema de refrigeración).

2) El poder empezar la extracción del DNA a partir de cierta cantidad de sedimento de parásitos obtenidos por centrifugación, de 0.02 a 0.06g. Donde inclusive si no se consigue el peso adecuado de un solo tubo se puede éste reunir de varios tubos y así evitar hacer un contaje celular para determinar a través de él si el cultivo cuenta o no la cantidad de parásitos necesarios para iniciar la extracción.



**Foto 5. Sedimento de parásitos de *L. chagasi* causante de leishmaniasis visceral, obtenidos por centrifugación en tubos Eppendorf .**

3) Si el procedimiento de extracción de DNA no se va a empezar después de las lavadas del sedimento con PBS, se les puede realizar solamente 2 lavadas y luego guardar el sedimento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y al empezar en otro momento la extracción se realiza la tercera lavada. (Empezando así el restos de los pasos del procedimiento duran unas 8 h).

4) Realizar la incubación con el buffer de extracción a  $56^{\circ}\text{C}$  , según referido por Belli y col., (1998).

En las tres extracciones realizadas, al chequear en cada caso el DNA obtenido se presentó lo indicado en la siguiente tabla:

## CEPAS DE LEISHMANIA

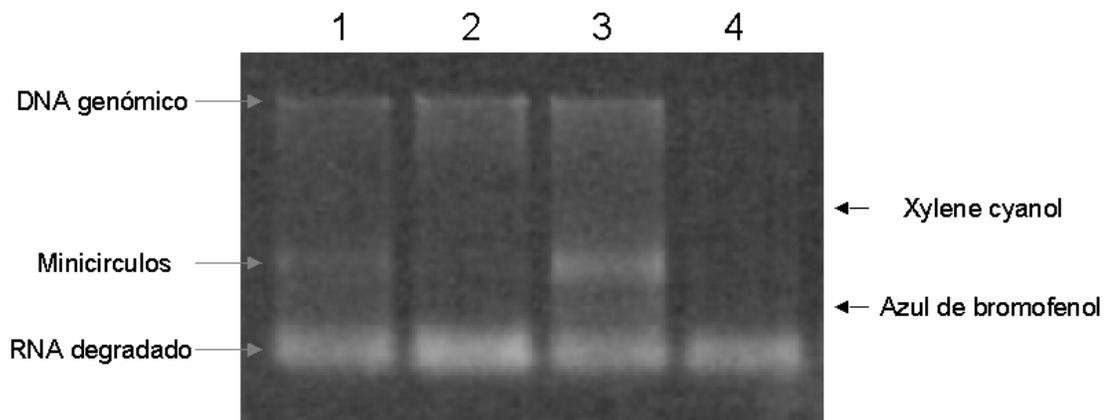
Extracciones del DNA	LEM 75	Ls 94	Laika
Extracción 1	DNA del minicírculo	DNA cromosómico	No se hizo extracción
Extracción 2	DNA del minicírculo	DNA cromosómico y DNA del minicírculo	DNA cromosómico y DNA del minicírculo
Extracción 3	DNA cromosómico y DNA del minicírculo	DNA cromosómico y DNA del minicírculo	DNA cromosómico y DNA del minicírculo

**CUADRO 1. Obtención de DNA cromosómico y/o DNA del minicírculo en *Leishmania infantum* (LEM 75 y Laika) y *Lishmania panamensis* (Ls 94).**

Como vemos en estos resultados de la extracciones junto con DNA cromosómico se podía obtener en algunos casos DNA de los minicírculos y en otros no obtenerse el cromosómico, sólo el del minicírculo.

Debido a que en ese momento el laboratorio no contaba con los medios para documentar los resultados obtenidos en los geles de electroforesis, a continuación se presenta una foto enviada por el PECET (Programa de Estudios y Control de Enfermedades

Tropicales), Universidad de Antioquía en Colombia, con la cual se confirmó la posición en el gel de agarosa, del DNA cromosómico y del minicírculo de *Leishmania*, obtenido de las extracciones realizadas.



**Foto. 6. Chequeo de la extracción del DNA de *Leishmania* por electroforesis en gel de agarosa usando como marcadores electrofóretico azul de bromofenol y xylene cyanol. Carriles 1 y 3 con DNA genómico y DNA minicírculo. Carriles 2 y 4 solo con DNA genómico.**

Debido a que cuando se aumenta el tiempo de precipitación del DNA, se aumenta la cantidad del DNA de bajo peso molecular (Arias y col., 2000), se probó obtener mas cantidad sólo del DNA de minicírculos haciéndole la siguiente modificación al protocolo antes presentado para la extracción del DNA de las cepas de *Leishmania* con excelente resultados:

- Colocar en un nuevo tubo Eppendorf el sobrenadante obtenido después de sedimentar el DNA obtenido en la primer precipitación con acetato sódico 3M y etanol puro.
- Dejar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min y centrifugar luego a 8.000 rpm por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Eliminar el sobrenadante y lavar 2 veces el sedimento con etanol al 80 %.
- Dejar secar el sedimento y resuspenderlo en 50  $\mu\text{l}$  de buffer TE.

El DNA de los minicírculos que se obtenía de las extracciones, es un DNA muy abundante en *Leishmania*, es normal y no influiría para nada en los experimentos RAPDs, de hecho podría ser que algunas de las amplificaciones correspondieran a este DNA, pero sería igual de significativo que el del DNA cromosómico( comunicación personal).

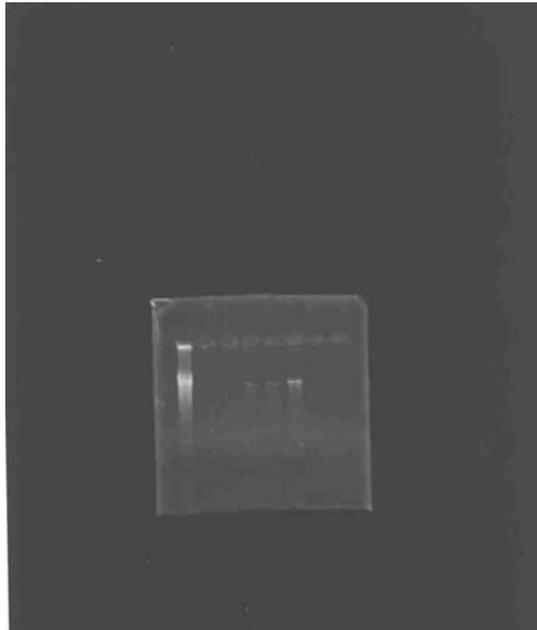
A falta de contar en el laboratorio con un marcador de concentración conocida que permitiera cuantificar por estimación de intensidad de fluorescencia la concentración del DNA de las muestras obtenidas de la extracción y como tampoco se cuenta con otra forma de cuantificación, se determinó la concentración de estos DNAs obtenidos, comparando la intensidad de fluorescencia con muestras de DNAs extraídas de plantas de tempate (*Jatropha curcas*) que con anterioridad habían sido cuantificada en el laboratorio. Así que contando con diluciones de 10 ng/ $\mu\text{l}$  de estos DNAs se pudo determinar que de manera similar el DNA cromosómico extraído de las cepas de *Leishmania* andaba por los 10 ng/ $\mu\text{l}$ , lo cual podría ser suficiente cantidad de DNA para ser utilizada en las amplificaciones por la técnica RAPD. Esto se puede observar en las fotos que a continuación se presentan, las cuales fueron tomadas en Enero del 2003, casi dos años después de realizadas las extracciones de estos DNAs, aunque en los geles chequeados con el fin de obtener estas

(Jiménez, A. 2002 Biólogo Molecular (correo electrónico) UAH.)

fotos ya no se pudo observar DNA del minicírculo, a pesar de que en los chequeos efectuados recién hecha las extracciones, este DNA aparecía en mayor cantidad (mayor intensidad de fluorescencia) que el cromosómico.



**Foto 7. De izquierda a derecha se presentan: DNA de tempate diluido a 10 ng/ $\mu$ l (carril 1) y DNA de LEM 75 (carriles 2 y 3)**



**Foto 8. De izquierda a derecha: DNA de tempate sin diluir (carril 1), DNA de Ls94 (carril 4), DNA de Laika (carril 5), DNA de tempate diluido 10 ng/ $\mu$ l.**

### **3.EXTRACCIONES DEL DNA DE *L. chagasi* CAUSANTE DE LEISHMANIASIS VISCERAL.**

Con un protocolo puesto a punto para la extracción del DNA de *Leishmania* y una vez que se consiguió aislar los parásitos de *L. chagasi* causante de leishmaniasis visceral, se procedió a coleccionar por centrifugación el sedimento de parásitos de todos los medios de cultivos provenientes de varios tubos. Se consiguió así, un sedimento con peso de 0.04 g que al aplicarle el protocolo establecido no fue posible extraer DNA (no apareció madeja de DNA durante la extracción, ni tampoco se vio ninguna fluorescencia en el gel de agarosa al ser chequeado sobre la luz ultravioleta).

Considerando que la ausencia de DNA pudiera ser debido a algún problema con algunas de las soluciones empleadas en la extracción, se volvió a preparar de nuevo todas las soluciones y a repetir la obtención de nuevo sedimento de parásitos en suficiente cantidad para volver a probar el mismo protocolo, pero tampoco se obtuvo resultado alguno.

Como una alternativa se pensó que se debería realizar a la par de la extracción del DNA de *Leishmania*, la extracción del DNA de otro microorganismo para que éste sirviera como un testigo o control de que el protocolo utilizado, su procedimiento y las soluciones empleadas eran las adecuadas en el caso de que si se obtuviera DNA del control.

Para ello se utilizó un cultivo de microorganismos que se obtiene de manera sencilla, al agitar el estigma de la flor de avispa (*Hibiscus rosa-sinensis*) en 10 ml de agua destilada (no estéril), para dejarla por 5 días a temperatura ambiente. De esta manera crecen una gran cantidad de microorganismos de distintos tipos, cuyo sedimento obtenido por centrifugación se usó como control a la par de la extracción del DNA de *Leishmania*. Como resultado se obtuvo en el gel de agarosa DNA en bastante cantidad de los microorganismos control, pero nada en el carril donde había sido colocada muestras extraídas de *Leishmania*.

Ante este otro resultado negativo, se procedió a buscar otro protocolo de extracción que se pudiera adecuar para lograr extraer el DNA. Usando de nuevo los microorganismos como control, se hicieron nuevas modificaciones al protocolo de extracción de DNA que ya se había adecuado con las cepas LEM 75, Ls 94 y Laika. A la vez se probó otro protocolo propuesto por Möller y col., (1992), por ser un protocolo más sencillo y rápido para la extracción del DNA, que permite combinar la inactivación de proteínas con SDS/proteinasa K con la precipitación de polisacáridos por CTAB caliente en la presencia de SDS y sales en alta concentración y sólo contiene un paso de precipitación de DNA con isopropanol evitando tratamientos con fenol-cloroformo y mas de un paso de precipitación que contienen la mayoría de los protocolos. A la vez se acortaron algunos pasos del protocolo de Möller para ver si resultaba de esa prueba un protocolo más corto y sencillo de extracción del DNA.

Para realizar estas pruebas se prepararon 4 tubos (enumerados del 1 al 4) con sedimentos de microorganismos obtenidos de la flor de avispa, cuyos pesos oscilaban entre 0.02 –0.06 g. En cada tubo se probó un protocolo distinto designado con el mismo número del tubo en que sería probado:

Protocolo1: el mismo protocolo adecuado ya para las cepas de *Leishmania*.

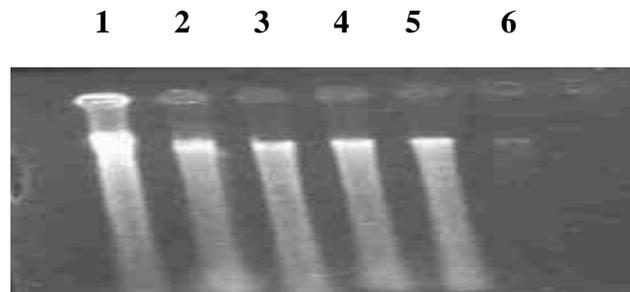
Protocolo2: el protocolo 1 con nuevas modificaciones ( usar Tris en el buffer de extracción y hacer los 3 pasos de extracción de la fase acuosa sólo con cloroformo-isoamilalcohol, para evitar usar fenol).

Protocolo 3: el protocolo de Möller.

Protocolo 4: el protocolo de Möller con modificaciones (acortando algunos pasos de este protocolo).

En todos los 4 tubos se obtuvieron bastante DNA. E inclusive cuando a los tubos en que se utilizó el protocolo 1 y 2 se transfirió a nuevos tubos 50 µl de la muestra resuspendida por primera vez en 300 µl de buffer TE y tratada con RNasa para guardarlo a – 20 °C , no siguiendo en estos casos los demás pasos de dichos protocolos, se observó la

presencia de DNA aunque en menor cantidad que la que se le aplicó los pasos completos de estos protocolos (éstos últimos no se muestran en la foto).



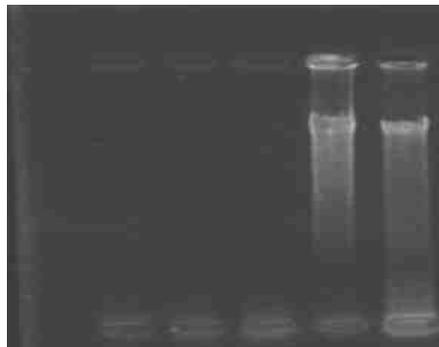
**Foto 9. De izquierda a derecha: DNA de tempate sin diluir (carril 1), DNA de microorganismos control probado con 4 protocolos distintos (carriles 2 a 5) y DNA de tempate diluido (carril 6)**

En base a estos resultados se procedió a ensayar un procedimiento de extracción de DNA denominándolo protocolo 5, donde se combinó pasos de los otros protocolos probados. Este procedimiento es el que a continuación se presenta:

1. Centrifugar a 4.000 rpm el medio de cultivo en tubos Eppendorf de 2 ml por 10 min a 4 °C, para obtener 0.02-0.04 g de sedimento.
2. Eliminar el sobrenadante y lavar 3 veces el sedimento con 500 µl de PBS . En cada lavada centrifugar como en 1. Se puede hacer solo 2 lavadas y guardar a -20 °C el sedimento hasta que este vaya a ser utilizado en la extracción. ( A partir de este momento el protocolo dura unas 4 h).
3. Resuspender el sedimento en 500 µl de buffer de extracción (EDTA 0.1 M, Tris 0.15 M, NaCl 0.15 M y SDS 0.5 %).
4. Añadir 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar 30 min por 1 h en baño maría a 56 °C, agitando los tubos cada 10 min.
5. Adicionar 65 µl de CTAB al 10 %, e incubar en baño maría a 65 °C por 10 min.
6. Agregar un volumen de cloroformo- isoamilalcohol (24:1) y dejar 15 min en hielo.
7. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C.

- 8.Extraer la fase acuosa y añadir 0.1 volumen de acetato sódico 3 M y 2.5 volumen de etanol puro frío.
- 9.Mezclar suavemente invirtiendo el tubo hasta que la madeja de DNA se haga evidente.
- 10.Sacar el sobrenadante para realizarle 2 lavadas al sedimento con 500  $\mu$ l de etanol al 70 % frío. (En cada lavada se sedimenta al DNA por centrifugación a 12.000 rpm por 10 min a 4°C).
- 11.Después de la última lavada se deja secando el sedimento a temperatura ambiente.
- 12.Resuspender el sedimento en 50  $\mu$ l de buffer TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM).
- 13.Tratar la muestras de DNA con 5  $\mu$ l de RNasa (10 mg/ml) incubando en baño maría por 10 min.
- 14.Finalmente conservar las muestras de DNA guardándolas a - 20 °C.

Este protocolo tuvo éxito con los microorganismos control obtenidos de la flor de avispa y no así en los parásitos de *L. chagasi*.



**Foto 10. De izquierda a derecha: En los carriles 1 a 3 no se vio DNA de *L. chagasi*, 4 y 5 DNA de microorganismos usados como control.**

Al sedimentar los parásitos para esta última prueba, se observó que en el sedimento quedaban restos pequeños de agar de la fase sólida, que por el color tiende a confundirse con el sedimento de parásitos, causando entonces una alteración en el peso del sedimento de parásitos obtenidos por centrifugación, así que la causa de las fallas de todas las extracciones de DNA realizadas hasta ese momento podría ser por no tener el peso adecuado de sedimento de parásitos y que los pesos de 0.02-0.06 g se alcanzaban con los restos de agar presentes en el sedimento.

Para superar este problema, se procedió a inocular los parásitos del medio bifásico a botellas solo conteniendo el medio líquido que se usa en el medio bifásico como sobrenadante, de esta manera se logró un crecimiento masivo de parásitos de los 3 a 7 días de la siembra, indicado por la turbidez amarillenta del medio y luego por una observación a campo cubierto de los parásitos en el microscopio a 450 X, tanto de forma libre como en rosetas formada por la agrupación de varios parásitos, la aparición de rosetas en los medios bifásico no eran muy frecuente de observar al microscopio.



**Foto 11. Crecimiento de *L. chagasi* en botellas con 50 ml de medio**

De esta manera se superó el problema del poco crecimiento de los parásitos en medios de cultivos esperándose que a más parásitos se podía obtener más sedimento de ellos y por lo tanto lograr la extracción del DNA. A partir de ese momento se utilizó los medios 3N Modificado, como cultivo para mantener vivos a los parásitos de *Leishmania* y a las botellas con medio líquido como cultivo para obtener los sedimentos de parásitos a ser usados en las pruebas de extracción del DNA.

Contrario a lo esperado, al sedimentar los parásitos que crecieron en botellas había prácticamente que juntar todos los sedimentos obtenidos de centrifugar todo el medio de una misma botella para obtener el peso de 0.02-0.06 g para empezar la extracción del DNA. De esta manera de 5 botellas de cultivo se obtuvieron sólo 5 tubos con sedimento, en los cuales se

probó los 5 protocolos (1, 2, 3, 4 y 5) descritos anteriormente, sin lograr con ninguno de ellos extraer DNA de los parásitos de *Leishmania*.

Al observar que en las centrifugaciones realizadas a los medios de cultivos en botellas, el sobrenadante que se desechaba permanecía todavía con turbidez amarillenta, se procedió a probar sedimentar a los parásitos en una centrifuga sin refrigeración pero con capacidad para tubos de 15 ml en los que colocaba 10 ml de medio. El sedimento obtenido después de la centrifugación a 4.000 rpm por 10 min, era suficiente para iniciar la extracción cuando eran pasado a los tubos Eppendorf de 2 ml. En este caso se observó al sobrenadante obtenido de las centrifugaciones con menor turbidez.

Al probar los 5 protocolos en estos sedimentos con la variante de no tratar las muestras con RNasa, para de esta manera confirmar si ninguno de los dos tipos de ácidos nucleicos, ni el DNA ni el RNA eran extraídos con el procedimiento probado, en este caso se pudo observar en el gel de agarosa la presencia de RNA después del azul de bromofenol utilizado como marcador electroforético, pero no se observó ninguna fluorescencia entre la zona comprendida entre los pozos y el azul de bromofenol, es decir no se observó DNA.

Estos resultados demuestran que los pesos de sedimento de parásitos entre 0.02 a 0.06g eran suficiente para poder extraer los ácidos nucleicos de los parásitos de *Leishmania*, ya que cuando se sigue un protocolo de extracción de DNA, hay cierta cantidad de RNA que copurifica con el DNA y para su eliminación es que se les aplica un tratamiento de RNasa. Como en esta última prueba no se aplicó este tratamiento se pudo observar la presencia del RNA.

Es posible que la ausencia del DNA se debiera a que éste se degradó durante el procedimiento, posiblemente al centrifugar en una centrifuga sin refrigeración y que se recalienta a los minutos de estar centrifugando, lo que pudo haber matado a los parásitos degradándose sus DNAs por las nucleasas liberadas.

La factibilidad de muchos estudios de variación del DNA dentro o entre poblaciones a menudo está limitada por la capacidad de aislar DNA de muchos individuos, en donde la posible degradación del DNA por la presencia de nucleasas nativas o compuestos secundarios, así como el co-aislamiento de polisacáridos contaminantes (inhibidores de futuras reacciones enzimáticas) dificulten el procedimiento (Hoelzel,1998). Inclusive muchas de las nucleasas presentes en las células pueden digerir al DNA. Cuando la célula es destruida pueden causar hidrólisis extensiva. Las nucleasas presentes en nuestras manos y/o que caen de nuestro cuerpo pueden causar degradación del DNA durante la purificación ( Arias y col., 2000).

Descartando la forma anterior de centrifugación se realizaron nuevamente las centrifugaciones en la microcentrifuga con refrigeración en tubos Eppendorf de 2 ml, aunque esto implicara más trabajo para conseguir mediante varias rondas de centrifugaciones la cantidad de sedimento de parásitos deseada para empezar la extracción . Para comprobar que después de centrifugar a 4.000 rpm por 10 min en el sobrenadante que quedaba aún turbio se encontraban parásitos, se probaron centrifugaciones a 4.000, 8.000 y 12.000 rpm para luego de cada centrifugación observar al microscopio a 450 X tanto al sedimento resuspendido como al sobrenadante obtenido después de la centrifugación. De esto resultó que los parásitos permanecían todavía vivos en el sedimento y en el sobrenadante presentándose al microscopio como se describe en el siguiente cuadro.

<b>Centrifugación (rpm)</b>	<b>SEDIMENTO</b>	<b>SOBRENADANTE</b>
<b>4.000</b>	Parásitos en cantidad regular, con pocas rosetas	Parásitos en regular cantidad .
<b>8.000</b>	Parásitos en más cantidad y con más rosetas.	Parásitos en menor cantidad.
<b>12.000</b>	Mayor cantidad de parásitos con rosetas más grandes.	Escasa cantidad de parásitos.

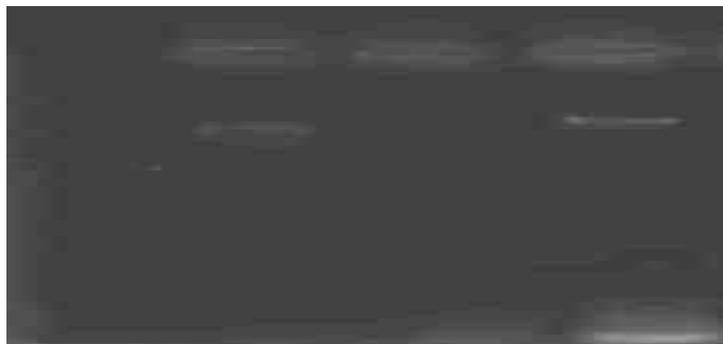
**CUADRO 2. Descripción de las cantidades de parásitos de *L.chagasi* presentes tanto en el sedimento como en el sobrenadante después de su centrifugación a 4.000, 8.000 y 12.000 rpm.**

Esto demuestra que aunque se centrifuguen el cultivo de parásitos a la máxima velocidad de la microcentrifuga 12.000 rpm los parásitos permanecían vivos y se lograba sedimentar mayor cantidad de ellos.

Para realizar esta prueba solo se utilizó el protocolo 5 por ser el más corto y sencillo y que al igual que los otros había dado presencia de RNA en la prueba anterior, pero al probar el protocolo 5 sin tratar con RNasa en estos sedimentos no se pudo obtener nada de DNA, sólo RNA en el gel de agarosa. Al volver a chequear estas muestras ya tratada con RNasa en un gel de agarosa que fue teñido al ser sumergido por 15 min en una solución de bromuro de etidio (en vez de agregárselo al gel antes que éste solidificara como en los casos anteriores), se observó un arrastre de DNA en la zona comprendida entre el pozo y el azul de bromofenol, lo que indica que el DNA extraído había sido degradado.

Nuevamente al probar el protocolo 5 pero esta vez añadiendo más NaCl, además del que contiene el buffer de lisis, para obtener una alta concentración de sales en el paso en que se agrega el CTAB, según refiere el protocolo de Möller y col., (1992), se logró en una de las muestras (de 4 probadas) obtener DNA en buenas condiciones y en cantidad suficiente para la finalidad de este estudio que es utilizarlo en amplificaciones RAPDs, permitiendo esto poder darle continuidad a la investigación aquí planteada.

1                      2                      3



**Foto 12. De izquierda a derecha: DNA de tempate 10 ng/ $\mu$ l (carril 1), muestras de *L.chagasi* que solo dio RNA, (carril 2) y con DNA y RNA (carril 3).**

***CONCLUSIONES***

- 1- Se logró aislar por primera vez en la UNAN-León, parásitos de *Leishmania chagasi* causante de leishmaniasis visceral usando los medios de cultivos bifásicos 3N Normal y Modificado.
- 2- El obtener con éxito el aislado de *Leishmania chagasi*, fue de gran utilidad para diagnosticar la enfermedad de leishmaniasis visceral en el paciente, al dar negativo el frotis de la muestra.
- 3- Se logró poner a punto previamente un protocolo de extracción de DNA en cepas de *Leishmania infantum* y *Leishmania panamensis*, con el fin de utilizarlo posteriormente para obtener los DNAs de interés para este estudio.
- 4- Con el protocolo establecido no se pudo obtener DNA de los parásitos de *Leishmania chagasi* causante de leishmaniasis visceral.
- 5- Probando usar otros protocolos de extracción de DNA se pasó de no obtener nada en el gel de agarosa a obtener DNA degradado con presencia de RNA (en pruebas sin usar RNasa), hasta que finalmente se logró, extraer DNA de una de las muestras..

## ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Alemán, T. J. y Alarcón, M. T. 1998. Leishmaniasis Visceral en Occidente: Casos Atendidos en el Hospital Escuela " Dr. Oscar Danilo Rosales Arguëllo" en el Período de Octubre de 1995 a Diciembre de 1997. Tesis. Doctor en Medicina y Cirugía. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 38 p.

Aranda-Torrelío, E. 1996. Leishmaniasis Visceral. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 53 (5):246-249.

Arias, M.C.; Díaz, D.G.; Diéguez, M. J.; Arana, V.; Puecher, D.; Bonafede, M.; Ciancio, J.; Bermacchi, D. y Robredo, C. 1996. Curso de Marcadores Moleculares en Plantas :Manual de Protocolos de Marcadores de ADN. Instituto de Genética Ewald A. Favret.CNIA-INTA-Castelar. Argentina.61 p.

Atias, A. y Neghme, A. 1994. Parasitología Clínica. 3ra. ed. Mediterráneo. Santiago de Chile. 120 p.

Bardaró, R.; Jones, T.C.; Lorenco, R.; Cerf, B.J.; Sampaio, D.; Carvalho, E.M.; Rocha, H.; Teixeira, R. and Jonson, W.D. 1986. A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area in Brazil. J Infect Dis. 154:639-649.

Beuver, P. Ch., Wayne, E. y Clifton, R. 1992. Parasitología Clínica. 2da. Ed. Salvat. Barcelona, España. 106 p.

Bej, A. K., Manbubani, M. H. and Atlas, R. M. 1991. Amplification of Nucleic Acids by Polimerase Chain Reaction (PCR) and other Methods and their Applications. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 23(¾):301-334.

Belli, A.; García, D.; Palacios, X.; Rodríguez, B.; Valle, S.; Videá, E.; Tinoco, E.; Marín, F. and Harris, E. 1999. Widespread Atypical Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Nicaragua. Am J Trop Med Hyg. 61(13):380-385.

Berríos, M. G. 1994. Extracción de ADN Genómico de Tres Variedades de Soya. Monografía. Licenciatura. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 31 p.

Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P. 1998. DNA Markers: Protocols, Application and Overviews. WILEY-LISS ED. USA. 364 p.

Cupolillo, E., Momen, H. and Grimaldi, G. 1998. Genetic Diversity in Natural Population of New World *Leishmania*. Mem Ist Oswaldo Cruz. 93(5): 663-668.

Díaz, M. V. 2001. Caracterización de la Diversidad Genética de Poblaciones Naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua a través de Marcadores Moleculares. Tesis, Doctoral. Alcalá de Henares, España. Universidad de Alcalá de Henares. 127 p.

Gallego, P. R. 1994. Análisis de la Variabilidad Genética del Centeno (*Secale cereale*) utilizando marcadores bioquímicos y moleculares. Tesis, MSc. Alcalá de Henares, España. Universidad de Alcalá de Henares. 63 p.

Harris, E.; Kropp, G.; Belli, A.; Rodríguez, B. and Agabian, N. 1998. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. Journal of Clinical Microbiology. 36(7):1998-1995.

Herwaldt, B. L. 1999. *Leishmaniasis*. The Lancet .354:1191-1199.

Hoelzel, A. R. 1998. Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. 2ª. Ed. IRL press, departament of Biological Sciences, University of Durham. USA.445p.

Lorente, A. J. y Lorente, A. M. 1995. El ADN y la Identificación Criminal y la Paternidad Biológica. Editorial COMARES. España. 93 p.

Messner, R.; Prillinger, H.; Altmann, F.; Lopandic, K.; Wimmer, K.; Molnar, O. and Wergang, F. 1994. Molecular Characterization and Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Mrakia* and *Sterigmatomyces Species*. International Journal of Systematic Bacteriology. 44(4): 694-703.

Möller, E. M.; Bahnweg, G.; Sandermann, H. and Geiger, H. H. 1992. A Simple and Efficient Protocol for Isolation of High Molecular Weight DNA. Nucleic Acids Research. 20: 6115-6116.

Páiz, I. S. y Sandoval, G. R. 2000. Comportamiento Clínico-Epidemiológico de la Leishmaniasis Cutánea en el Municipio de "El Castillo", Río San Juan, en el Período de Agosto de 1997 a Marzo de 1998. Tesis, Doctor en Medicina y Cirugía. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 60 p.

Pearson, R. D.; Cox, G.; Jerónimo, S. M. R.; Castracane, J.; Drew, J.S.; Evans, T. and Alencar, J. E. 1992. Visceral Leishmaniasis: a Model for Infection-Induced Cachexia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47(1):8-15.

Pereza, J., Urbina, A. and Zeledon, R. 1998. Zymodeme and Serodeme Characterization of *Leishmania* Isolates Obtained from Costa Rican Patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93(3): 283-287.

Peters, W. and Killick-Kendrick, R. 1987. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volumen I. Academic Press. London. 180 p.

Robynt, F. J and White, B. J. 1987. Biochemical Techniques: Theory and Practice. Brooks/Cole Publishing Company. California, USA. 407p.

Stieles, J. I.; Lemme, C.; Sondur, S.; Morshidi, M. B. and Manshardt, R. 1993. Using Random Amplified Polymorphic DNA for Evaluating Genetic Relationships Among Papaya Cultivars. Theor Appl Genet. 85: 697-701.

Tingey, S. V. and Tufo, J. P. 1993. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA. *Plant Physiol.* 101: 349-352.

Valle, S.; Corrales, E.; Rivera, T. y Peralta, J.A. 1998. Comportamiento Clínico Epidemiológico de la Leishmaniasis Visceral en el occidente de Nicaragua. Informe Final. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 25 p.

Ville, C.; Solomon, P.E.; Berg, R. L. y Martin W. D. 1996. *Biología de Ville*. 3ª. Ed. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México. 1193 p.

Williams, L. A. y Ramos, E. D. 2000. Uso de Marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA para Evaluar la Variabilidad Genética en 7 Cultivares de *Jatropha curcas* L. Tesis, Licenciatura en Biología. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 61 p.

Williams, J.G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research.* 18(22): 6531-6535.