

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO
AGRONOMÍA-VETERINARIA



DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *LEISHMANIA* SPP. EN CANINOS
DOMÉSTICOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) DENTRO DE LA ZONA DE
INFLUENCIA DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA “MONTES AZULES” EN EL
ESTADO DE CHIAPAS, MÉXICO.

Por

RAYMUNDO ISRAEL PÉREZ ZUMAYA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ABRIL, 2021

DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *LEISHMANIA* SPP. EN CANINOS
DOMÉSTICOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) DENTRO DE LA ZONA DE
INFLUENCIA DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA “MONTES AZULES” EN EL
ESTADO DE CHIAPAS, MÉXICO.

Dirección de Tesis



DR. JUAN JOSÉ ZARATE RAMOS
Director



DR. GUSTAVO MORENO DEGOLLADO
Co-Director



DR. MARCO ANTONIO CANTÚ MARTÍNEZ
Co-Director



DR. JORGE JESÚS RODRÍGUEZ ROJAS
Co-Director Externo



DRA. KARINA WENDOLINE VÁZQUEZ CISNEROS
Co-Director

DETERMINACIÓN MOLECULAR DE *LEISHMANIA* SPP. EN CANINOS
DOMÉSTICOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) DENTRO DE LA ZONA DE
INFLUENCIA DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA “MONTES AZULES” EN EL
ESTADO DE CHIAPAS, MÉXICO.

Comité de Tesis



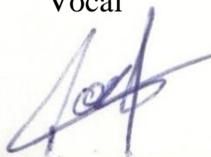
DR. JUAN JOSÉ ZARATE RAMOS
Presidente



DR. GUSTAVO MORENO DEGOLLADO
Secretario



DR. MARCO ANTONIO CANTÚ MARTÍNEZ
Vocal



DR. JORGE JESÚS RODRÍGUEZ ROJAS
Vocal



DRA. KARINA WENDOLINE VÁZQUEZ CISNEROS
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jehová, mi Dios, ante todo y por todo.

A mi bella familia; mi madre por enseñarme siempre a trabajar a pesar de las adversidades, mi padre por enseñarme a ser dedicado y justo en mi profesión, a mi hermana que me motiva día a día a ser mejor persona y mejor Médico Veterinario Zootecnista y a mi cuñado por siempre estar presente cuando necesite de su ayuda.

A mi amiga, la MVZ. Erika Jeanneth Porras y todos los integrantes y exintegrantes del laboratorio de parasitología (Joaquín Arango, Ricardo Zúñiga, Miguel Garza, Aurelio Torres y Brandon Cortez) por su ayuda y apoyo en la colecta de las muestras, a las técnicas de los laboratorios de Genética, Bacteriología y Virología, ya que, sin la ayuda de todos ellos, hubiera sido imposible culminar este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de posgrado por todas las vivencias y buenos momentos que pasamos durante la maestría a ellos: Gloria, Valeria, Fernando y Saúl gracias por su amistad, Argelia y Héctor que más que compañeros fueron como hermanos para mí, siempre estuvieron ahí para complementar la “Triada Epidemiológica” les deseo todo el éxito y felicidad del mundo para ustedes, a todos ustedes, gracias.

A todos mis asesores que siempre tuvieron el tiempo, la paciencia, la elocuencia, por su apoyo y los consejos, todo esto me ayudo a ser mejor persona, mejor médico, mejor profesionista, gracias eternas a ustedes:

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño, por ser siempre un gran maestro en toda la extensión de la palabra.

D.Ph. Gerardo Méndez Zamora, por siempre ayudarme sin importar la hora, el día o las dificultades.

Dra. Rosa María Sánchez Casas, por el apoyo incondicional en el viaje a Chiapas, y su experiencia que marcó la diferencia.

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez, por su apoyo con el laboratorio de Virología.

Agradecimiento y reconocimiento al director de la FMVZ-UANL el Dr. Gustavo Moreno Degollado por todas las facilidades y apoyo recibido para la realización del presente estudio y consecución de la Maestría en Ciencias.

Por último, pero no menos importante a mi maestro y guía en el tema de Parasitología Veterinaria, el Dr. Juan José Zarate Ramos, desde la licenciatura me inculcó el amor por esta rama de la veterinaria, le agradezco su tiempo, consejos y conocimientos impartidos a mi persona, GRACIAS.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis padres, mi hermana, cuñado, y mis amistades que siempre me apoyaron en todo momento, en mis metas, logros, triunfos y fracasos. Gracias por siempre estar ahí para mí.

A mi abuelita María Isabel Aguilar González (QEPD), por siempre darme sus consejos y siempre animarme a ser una mejor persona cada día, a mis tías que son mi alma entera.

A todos aquellos doctores, médicos y técnicas de laboratorio (Leslie, Cynthia y Sandra), les agradezco su ayuda, paciencia y por compartir conocimientos conmigo, muchas gracias.

A mis asesores por apoyarme en culminar mi formación académica.

A Jehová mi Dios, por siempre acompañarme en mi camino, darme la fortaleza de avanzar en la adversidad, y bendecirme con las personas que siempre están a mi lado.

Este trabajo de tesis fue financiado a través de:

El estudio fue financiado parcialmente mediante el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica -2019 (PAICyT 2019) de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN a través de Dirección de Investigación de la Secretaria de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico para el proyecto: “Determinación molecular de *Leishmania* spp. en caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) dentro de la zona de influencia de la Reserva de la Biósfera “Montes Azules” en el estado de Chiapas, México. Final.”.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	VI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT.....	XV
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1. HIPOTESIS	5
2. OBJETIVO GENERAL.....	6
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. PROBLEMÁTICA.....	9
6. ANTECEDENTES	11
7. REVISIÓN DE LITERATURA	13
7.1. Aspectos generales de la Leishmaniosis.....	13
7.2. El parásito <i>Leishmania</i>	14
7.3. Taxonomía y clasificación del parásito <i>Leishmania</i>	16
7.4. Reservorios de <i>Leishmania</i>	17
7.5. Estructuración genómica de <i>Leishmania</i>	17
7.6. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	18
7.7. El vector	23
7.8. Morfología de Phlebotominae (<i>Lutzomyia</i> spp.)	24
7.8.1. El adulto	26
7.9. Interacción del parásito dentro del vector	27
7.10. Epidemiología	29
7.11. Leishmaniosis canina.....	31
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
8.1. Área de estudio	38
8.2. Permisos	40
8.3. Obtención de muestras.....	41
8.4. Selección de la muestra	42
8.5. Encuesta	43
8.6. Extracción de ADN.....	43

8.6.2.	Datos de consideración previo a la extracción de ADN.....	44
8.6.3.	Preparación del extracto de ADN.	46
8.6.4.	Cantidades de muestras	46
8.6.5.	Protocolo utilizado (para sangre anticoagulada fresca o congelada)	47
8.6.6.	Procedimientos	47
8.7.	Cebadores.....	48
8.8.	Elección del blanco de amplificadores	48
8.9.	Amplificación de ADN de <i>Leishmania</i> spp.....	49
8.10.	Electroforesis en gel de agarosa.....	49
8.11.	Control positivo	49
8.12.	Análisis estadístico.....	49
9.	RESULTADOS.....	51
9.1.	Población canina.....	51
9.2.	Prevalencia de infección por <i>Leishmania</i> spp.....	52
9.3.	Relación de los resultados positivos con los signos clínicos de leishmaniosis, edad, sexo, talla y complexión física de los caninos (<i>Canis familiaris</i>).....	53
9.4.	Análisis estadístico.....	59
10.	DISCUSIÓN.....	61
11.	CONCLUSIÓN.....	63
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	ANEXO A.....	79
	ANEXO B.....	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de las especies de <i>Leishmania</i> , las formas clínicas, vector y reservorio comprobado o sospechoso en la transmisión de esta enfermedad en los países del Continente Americano.	32
Cuadro 2. Datos poblacionales, socioeconómicos y geográficos de las localidades muestreadas. *Secretaria de Desarrollo Social (SEDESOL).....	39
Cuadro 3. Aplicaciones en las que se utilizó este kit comercial (Bio Basic®)	44
Cuadro 4. Cantidad de muestra sanguínea a utilizar, para la correcta extracción de ADN ..	46
(Bio Basic®).....	46
Cuadro 5. Distribución de prevalencia por cada zona de estudio.....	52
Cuadro 6. Signos clínicos característicos de leishmaniosis que se presentaron en caninos muestreados.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de Promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. (Besteiro, S., <i>et al.</i> 2007).....	15
Figura 2. Clasificación de <i>Leishmania</i> y formas clínicas de leishmaniosis que produce cada especie (Bañuls, A., <i>et al.</i> 2002; Bates, P., 2007).....	16
Figura 3. La metacicloogénesis ocurre en el interior del vector, por el cual los promastigotes se vuelven altamente infectivos y resistentes al sistema inmune (Turco, S., <i>et al.</i> , 2001; Muskus, C., <i>et al.</i> , 2002).....	21
Figura 4. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. (Imagen elaborada por Mariana Ruiz Villarreal).....	22
Figura 5. Cabezas de <i>Lutzomyia</i> macho (A) y hembra (B).....	25
Figura 6. <i>Lutzomyia</i> spp., tomando una ingesta sanguínea. Fuente: Wilson, 2014.....	25
Figura 7. <i>Lutzomyia</i> spp., ingiriendo sangre. Fuente: Wilson, 2014.....	26
Figura 8. Clasificación de <i>Leishmania</i> spp. según su localización en el vector.....	28
(Adaptado de Lainson, R., <i>et al.</i> , 1987).....	28
Figura 9. Estratificación de riesgo de Leishmaniosis cutánea y mucosa por segundo nivel administrativo subnacional, Américas, 2017. Fuente: SisLeish-OPS/OMS – Datos disponibles por los Programas de Leishmaniosis de los países, acceso el 01 de diciembre del 2018.	29
Figura 10. Ubicación de la Reserva de la Biosfera “Montes Azules” (REBIMA), en el Estado de Chiapas, México.	38
Figura 11. Distribución de las localidades dentro de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biosfera “Montes Azules” (REBIMA).	40
Figura 12. Flujograma detallado del proceso de extracción a cada muestra sanguínea.	45
Figura 13. Distribución de los caninos (<i>Canis familiaris</i>) positivos para parásitos del género <i>Leishmania</i> spp. divididos por zonas.....	51
Figura 14. PCR punto final, en la imagen se observan 7 muestras en total, de las cuales solo 5 muestras amplificaron para <i>Leishmania</i> spp. y en las otras dos muestras se aprecian negativas a la presencia de ADN de <i>Leishmania</i> spp. MPM: marcador de peso molecular.53	
Figura 15. Caninos con signos clínicos característicos de Leishmaniosis y que resultaron resultado positivo al PCR.	54
Figura 16. Toma de muestra sanguínea a canino (<i>Canis familiaris</i>) sin la sintomatología aparente de Leishmaniosis canina.	54
Figura 17. Canino (<i>Canis familiaris</i>) con la sintomatología aparente de Leishmaniosis canina, (presentó Caquexia, alopecias, lesiones cutáneas y onicogrifosis) y al procesar la muestra por PCR, tuvo resultado positivo para <i>Leishmania</i> spp.....	55

Figura 18. Variación de las edades de los caninos (<i>Canis familiaris</i>) positivos a <i>Leishmania</i> spp.	56
Figura 19. Variación de las tallas de tamaño de los caninos (<i>Canis familiaris</i>) positivos a <i>Leishmania</i> spp.	56
Figura 21. Variación de los sexos en los caninos (<i>Canis familiaris</i>) positivos a <i>Leishmania</i> spp.	58
Figura 22. En esta grafica se muestra la diferencia significativa entre los casos positivos y negativos de las diferentes zonas muestreadas. (Ho: Las muestras no difieren entre las zonas, Ha: Las muestras difieren entre las zonas).	59
Figura 23. En esta grafica se muestra el nivel de significancia de 0.05, indica que se rechaza la Ho y se concluye que el número de muestras negativas y positivas tienen una diferencia estadística entre las zonas. (Ho: Las muestras no difieren entre las zonas, Ha: Las muestras difieren entre las zonas).	60

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad causada por un protozoo difásico del género *Leishmania* spp., y que representa un problema de Salud Pública importante en América Latina, debido a la escasez de datos epidemiológicos y falta de medidas de control, que dependen precisamente de los datos epidemiológicos. En el ciclo heteroxeno de la *Leishmania* spp. uno de los participantes como hospedantes intermediarios son dípteros hematófagos de la subfamilia Phlebotominae, que habita en Chiapas, un estado localizado al sur de la República Mexicana, sobre los cuales las medidas preventivas y de control y/o erradicación de este, son complicadas. El perro es hospedante de algunas de las especies de *Leishmania* spp., causante de las formas clínicas como: cutánea, mucocutánea y visceral, por lo tanto, es importante conocer dentro de las poblaciones en riesgo que generalmente son poblaciones marginadas y de bajos recursos económicos, ubicadas en zonas remotas, por ello resulta de vital interés determinar la presencia de este parásito en el perro doméstico (*Canis familiaris*) una especie animal sinantrópica.

La Leishmaniosis es una enfermedad de importancia en Salud Pública, con gran capacidad patógena tanto para humanos como para los animales infectados, en el ser humano la enfermedad tiene una distribución mundial; es endémica en 98 países. Se estima que más de 12 millones de personas están infectadas en todo el mundo, con aproximadamente 700,000 a 1 millón de casos nuevos de diferentes formas clínicas y 20.000 a 30.000 muertes anuales. Existen tres formas clínicas principales de la enfermedad: Leishmaniosis visceral (LV), que es mortal si no se trata en más del 95% de los casos, la Leishmaniosis cutánea (LC): es la forma más frecuente y produce en las zonas expuestas del cuerpo lesiones cutáneas, sobre todo ulcerosas, son causa de discapacidad grave, la última es la Leishmaniasis mucocutánea (MC): provoca la destrucción parcial o total de las mucosas de la nariz, boca y garganta. Más del 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea ocurren en América Central, América del Sur y Etiopía.

Al menos 23 especies de *Leishmania* spp. son causantes de enfermedades, la forma clínica de la enfermedad que se presenta con mayor frecuencia en México es la LC, conocida coloquialmente como “ulcera del chiclero”, ya que se presenta fundamentalmente en el Sur

de México y se relaciona a personas que acceden a zonas selváticas en busca de la resina obtenida del árbol del Chicle (*Manilkara zapota*).

El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *Leishmania* spp., en caninos domésticos (*Canis familiaris*), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El estudio se realizó en comunidades geográficamente ubicadas dentro de la zona de influencia de una Reserva Natural Federal conocida como “Reserva de la Biosfera Montes Azules”, a cargo de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Se tomaron muestras de sangre periférica e hisopado ocular, así como también se realizó la aplicación de encuestas para determinar el conocimiento de estos pobladores dueños de las mascotas muestreadas.

Los resultados arrojaron un 46.2% de caninos positivos de las 150 muestras tomadas en las 4 zonas dentro de la zona de influencia de la Reserva de la Biosfera Montes Azules en Chiapas, México, dando como resultado un porcentaje de prevalencia de *Leishmania* spp. para cada zona donde tomaron las muestras, para los resultados positivos se recolectaron parámetros de los caninos como: signos clínicos, variación de edades, tamaño, complexión física y sexo.

Se concluyó demostrando la presencia y prevalencia de *Leishmania* spp., dentro de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biósfera Montes Azules, donde las poblaciones caninas pueden actuar potencialmente como reservorio de la leishmaniosis, al mismo tiempo se demostró que la técnica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar la presencia del parásito en poblaciones canina siendo una herramienta fácil para poder detectar focos de transmisión activa.

ABSTRACT

Leishmaniosis is a disease caused by a diphasic protozoan of the genus *Leishmania* spp., and it represents an important Public Health problem in Latin America, due to the scarcity of epidemiological data and lack of control measures, which depend precisely on epidemiological data. In the heteroxene cycle of *Leishmania* spp., one of the participants as intermediate hosts are hematophagous diptera of the Phlebotominae subfamily, which lives in Chiapas, a state located in the south of the Mexican Republic, on which preventive and control and / or eradication measures are complicated. The dog is the host of some of the *Leishmania* spp. species, causing clinical forms such as: cutaneous, mucocutaneous and visceral, therefore, it is important to know within the populations at risk that they are generally marginalized populations with low economic resources, located in remote areas, therefore it is of vital interest to determine the presence of this parasite in the domestic dog (*Canis familiaris*), a synanthropic animal species.

Leishmaniosis is a disease of importance in Public Health, with a great pathogenic capacity for both humans and infected animals. In humans, the disease has a worldwide distribution; it is endemic in 98 countries. It is estimated that more than 12 million people are infected worldwide, with approximately 700.000 to 1 million new cases of different clinical forms and 20.000 to 30.000 deaths annually. There are three main clinical forms of the disease: Visceral Leishmaniosis (VL), which is fatal if not treated in more than 95% of cases, Cutaneous Leishmaniosis (CL): it is the most frequent form and occurs in exposed areas of the Body skin lesions, especially ulcerative, are the cause of serious disability, the last one is Mucocutaneous Leishmaniosis (MC): it causes partial or total destruction of the mucous membranes of the nose, mouth and throat. More than 90% of mucocutaneous leishmaniosis cases occur in Central America, South America, and Ethiopia.

Leishmania spp. cause diseases, the clinical form of the disease that occurs most frequently in Mexico is CL, known colloquially as "ulcera del chiclero", since it occurs mainly in southern Mexico and is related to people who access jungle areas in search of the resin obtained from the Chicle tree (*Manilkara zapota*).

The objective of this research was to determine the presence of *Leishmania* spp., in domestic canines (*Canis familiaris*), by means of the polymerase chain reaction (PCR). The study was carried out in communities geographically located within the area of influence of a Federal Natural Reserve known as the “Montes Azules Biosphere Reserve”, in charge of the Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Peripheral blood samples and ocular swabs were taken, as well as the application of surveys to determine the knowledge of these residents who owned the sampled pets.

The results showed 46.2% of positive canines of the 150 samples taken in the 4 zones within the zone of influence of the Montes Azules Biosphere Reserve in Chiapas, Mexico, resulting in a percentage of prevalence of *Leishmania* spp. for each area where the samples were taken, for the positive results, parameters of the canines were collected such as: clinical signs, age variation, size, physical complexion and sex.

We concluded by demonstrating the presence and prevalence of *Leishmania* spp., within the zone of influence of the Montes Azules Biosphere Reserve, where canine populations can potentially act as a reservoir of leishmaniasis, at the same time it was demonstrated that the technique through the polymerase chain reaction (PCR) allows to detect the presence of the parasite in canine populations being an easy tool to detect foci of active transmission.

According to the World Health Organization (WHO) The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Americas is very complex, as variations are observed in transmission cycles, reservoirs, sandfly vectors, and clinical manifestations and response to treatment. In addition, there are several species of *Leishmania* spp, that are in the same geographical area.

1.- INTRODUCCIÓN

La Leishmaniosis es una enfermedad que es causada por un protozooario (De *protos*, primero; y *zoom*, animal.), una de las características principales de los protozoos es que son organismos unicelulares, capaces de colonizar en cavidades, lúmenes, tejidos y sangre, en la actualidad existen muchas enfermedades causadas por protozoarios (Ocádiz, 1999). La *Leishmania* spp. es un parásito flagelado menor o igual a 12 μm que prolifera y se diferencia en el tubo digestivo de ciertos dípteros, tiene forma redondeada, ovoide, con un diámetro de 3 a 4 μm . El citoplasma contiene un núcleo grande redondeado, y un kinetoplasto baciliforme muy visible y un pequeño kinetosoma puntiforme, poco visible (Desachy, 2006). Tras una tinción de May Grünwald Giemsa, el citoplasma es violáceo; el núcleo y kinetoplasto, rojo oscuro. La vesícula y a continuación la célula se rompen. Los parásitos así liberados pasan, por endocitosis, a otra célula fagocitaria mononuclear (Gallego, M., & Riera, C., 2000).

El agente etiológico presenta un ciclo de vida dimórfico que consiste en una fase extracelular (promastigote), en la cual se multiplica y desarrolla dentro del tracto de ciertos tipos de flebotominos (insectos hematófagos) y una fase intracelular (amastigote) que se desarrolla en el interior de vacuolas fagolisosomales de macrófagos y otros fagocitos del hospedante vertebrado (Sacks, D., & Kamhawi, S., 2001).

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, a los que pertenecen 31 especies patógenas para mamíferos, incluyendo 22 especies patógenas para el humano, de las cuales 15 se presentan en América (World Health Organization, 2017; Akhoundi, M., *et al.*, 2016).

Este género ampliamente distribuido, existen tres principales formas clínicas de la enfermedad, que causan en los humanos, la Leishmaniosis cutánea (LC) conocida comúnmente como “ulcera del chiclero”, Leishmaniosis mucocutánea (MC) conocida comúnmente como “espundia” y Leishmaniosis visceral (LV) conocida en otras partes del mundo como “kala-azar” (Jawetz *et al.*, 1979).

En México la Leishmaniosis se ha caracterizado por ser una enfermedad que se presenta en las regiones tropicales y subtropicales transmitida por la picadura de díptero hematófago del de la subfamilia Phlebotominae (Ibáñez, S., 1999). La transmisión también ha sido reportada

por accidente de laboratorio según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017). La leishmaniosis es una de las siete enfermedades tropicales más importantes y representa un grave problema de salud mundial, tiene una distribución mundial encontrándose en todos los continentes (Europa, África, Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y América) a excepción de la Antártica y Oceanía (Roncal, C., 2016). Las características clínicas incluyen una amplia gama de expresiones con diferentes grados de severidad que dependen de las especies de *Leishmania* spp. involucrada y la respuesta inmune del hospedante (Guerrero, *et al.*, 2017).

En las Américas, actualmente se registra un promedio de 56.000 casos de leishmaniosis cutánea y mucosa y 3.800 casos de leishmaniosis visceral al año, la leishmaniosis cutánea se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos (Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México), donde, el 27% de casos de leishmaniosis cutánea se presentan en zonas fronterizas (Leishmaniosis en las Américas, OPS, 2017).

La enfermedad es típica de sitios que se localizan en altitudes que oscilan en el rango de 0 a 1.500 msnm y aunque se han registrado casos sobrepasando esta altitud, temperaturas superiores a 20 ° C y una precipitación anual de 1.500 a 3.000 mm (García, 1988). En México la población comúnmente afectada por la Leishmaniosis son pobladores que acceden a zonas selváticas o viven en la periferia de estas zonas, siendo más afectados los agricultores, recolectores de árboles de goma, cultivadores de cacao y plantas de plátanos, madereros, cazadores, personal militar, biólogos, ornitólogos y quienes practican el turismo ecológico y/o senderismo (Torres, E., *et al.* 2017; Incháustegui A., 1918; Córdova, C., *et al.* 1993).

En México, esta enfermedad se conoce desde la época precolombina y todas las formas clínicas de la leishmaniosis se han reportado (Alberto, N., 1990). La enfermedad se ha reportado en 25 estados de la República Mexicana (78% del territorio), localizados en cinco regiones: Península: Yucatán, Quintana Roo y Campeche, Golfo: Veracruz, Tabasco y Tamaulipas, Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa, Centro: Puebla, Morelos, Hidalgo, México, San Luis Potosí y Tlaxcala y Norte: Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango y Nuevo León (Alvar, J. *et*

al. 2012; Becker, I. *et al.*, 2005; Sánchez, L., *et al.*, 2010; Sinave/DGE/Salud, 2015).

Dentro de la República Mexicana se tienen registros de *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. infantum*, agentes causales de LC, LMC y LV, respectivamente, aunque la transmisión de *L. panamensis* y *L. guyanensis* podría ocurrir por su condición fronteriza con Guatemala, donde estas últimas especies son endémicas (Alvar, J. *et al.* 2012).

En la República Mexicana, la *L. mexicana* es la especie con el mayor número reportes, siendo el agente causal de la Leishmaniosis Cutánea (LC) en humanos, en los estados de Campeche, Chiapas, Ciudad de México, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Pérez, J., *et al.*, 2009; Ochoa, D., *et al.*, 2012).

Los estudios serológicos realizados en la comunidad de Becanchén en el estado de Yucatán, han documentado anticuerpos específicos en el 17% de la población, asimismo, en Tabasco (estado sureño de México), una incidencia y prevalencia de una tasa hasta el 9.41 por cada 100.000 habitantes, por lo tanto, se consideran unas zonas altamente endémicas (Guerrero, E., *et al.*, 2017).

Se ha logrado observar una serología positiva en el 20.42% del personal militar que trabaja en la zona de la Península de Yucatán, siendo los dos principales vectores: *Lutzomyia olmeca* y *Lutzomyia cruciata* (Torres, *et al.*, 2017).

La dispersión acelerada de las leishmaniosis hacia distintas regiones y escalas ecológicas (ecozonas, biomas y ecotopos) podría explicarse a través de la dinámica poblacional de los dos principales hospedantes; los humanos (leishmaniosis humana) y caninos (leishmaniosis canina) (Ready, P., 2008).

El autor y colaboradores mencionan que el diagnóstico de *Leishmania* spp. en el examen microscópico requiere de un considerable grado de experiencia para distinguir los amastigotes en el interior de la célula hospedante, mientras que las técnicas serológicas son una herramienta útil pero no se puede diferenciar entre una infección activa a una infección pasada. (Paternina, G., *et al.*, 2013).

En la actualidad, la técnica de PCR ha logrado una mejora importante en el diagnóstico de esta enfermedad y en el conocimiento de aspectos importantes de la interacción entre el parásito y el reservorio (Travi, B., *et al.*, 1998).

La sensibilidad de la técnica molecular PCR suele ser alta en comparación con otras técnicas, aunque depende de las características de la región genómica diana. Esta sensibilidad puede incrementarse mediante el uso de cebadores dirigidos a secuencias multicopias como secuencias repetitivas del kinetoplasto, así como a las familias génicas multicopias (Fernandes, O. *et al.*, 1994; Cupolillo, E. *et al.* 1995).

El canino puede ser usado como un indicador biológico para establecer la endemidad real de la leishmaniosis en una zona bajo estudio, ya que el perro en estos ecosistemas tiene contacto con los reservorios silvestres de la enfermedad, con los vectores y por su cercanía con los seres humanos hacen que se conviertan en un excelente reservorio del parásito (El Harith, A., et al., 1989).

Considerando estas razones y teniendo en cuenta que son escasos los estudios de la Leishmaniosis en general y particularmente de la enfermedad en el canino doméstico en la zona sur de México, en la presente investigación se determinó la prevalencia de la Leishmaniosis en caninos (*Canis familiaris*) dentro de la zona de influencia de la reserva de la Biosfera Montes Azules (REBIMA) en el estado de Chiapas, México, utilizando el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés donde utilizaremos el método de PCR punto final a cada muestra sanguínea extraída de los caninos domésticos.

1. HIPOTESIS

Existe una alta prevalencia de *Leishmania* spp., en poblaciones de caninos domésticos (*Canis familiaris*) dentro de la zona de influencia de la Reserva de la Biósfera “Montes Azules” en el estado de Chiapas.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la prevalencia de la infección por *Leishmania* spp. mediante la técnica de PCR punto final en poblaciones de caninos (*Canis familiaris*) de áreas rurales dentro de la zona de influencia, de la Reserva de la Biósfera “Montes Azules” en el estado de Chiapas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar el parásito *Leishmania* spp. en caninos por técnicas moleculares.
- 2.-Analizar la prevalencia de la infección por *Leishmania* spp. en caninos.
- 3.- Identificar las áreas de riesgo epidemiológico en cuatro áreas geográficas, de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biósfera “Montes Azules” en el estado de Chiapas, México.

4. JUSTIFICACIÓN

En México se presentan cuatro de las formas clínicas de la enfermedad, donde se han reportado en 25 estados de la República Mexicana (78% del territorio), localizados en cinco regiones (Alvar, J., *et al.* 2012). No obstante, el incremento de reportes de Leishmaniosis proviene del sureste de la República Mexicana (Javier, S. *et al.* 2014). Dentro de los estados del sureste la prevalencia más alta de las manifestaciones clínicas de LC y LV se registra en el estado de Chiapas (Becker, I., *et al.* 2005; Sánchez, G., *et al.* 2001).

Recientemente, se localizó un foco de Leishmaniosis en zonas rurales en varias localidades del estado de Chiapas, en el cual incluye a 23 municipios, 2.687 localidades y 1.2 millones de habitantes en riesgo (Pacheco, O., *et al.* 2014). Los municipios con alta prevalencia de Leishmaniosis incluyen a Tuxtla Gutiérrez, Chiapa de Corzo, Palenque, Pichucalco, Las Margaritas y Ocosingo (Becker, I., *et al.* 2005). Los habitantes afectados por la Leishmaniosis, generalmente provienen de comunidades en niveles de pobreza altos, reflejada en los bajos recursos, educación limitada y difícil acceso a los servicios de salud.

La leishmaniosis es una parasitosis de gran importancia a nivel nacional y en los últimos años ha aumentado su frecuencia y distribución dentro de la República Mexicana. Esto se puede deber al calentamiento global, a la continua invasión de los ambientes selváticos por el ser humano por motivos urbanísticos, para adquirir mayores terrenos de cultivo y una de las teorías en las cuales en esta investigación demostramos que los caninos son reservorios que ayudan a distribuir esta enfermedad dentro de estas comunidades sin la necesidad de que los habitantes se adentren a las zonas selváticas.

El presente trabajo permite demostrar la presencia de *Leishmania* spp. en caninos domésticos dentro de este ecosistema, una de las Áreas Naturales Protegidas (ANP), de México más ricas en biodiversidad, y que forma parte de la Selva Lacandona, contando con una superficie de 331 mil 200 hectáreas, donde ofrecemos una mirada integral, sobre la Leishmaniosis, que representa un problema de Salud Pública, considerándose como un problema desatendido o rezagado y que afectan a los sectores más vulnerables y marginales de la población en México.

5. PROBLEMÁTICA

Si bien 25 estados de la República Mexicana reportan casos, actualmente la población en riesgo se distribuye en 13 entidades federativas con aproximadamente nueve millones de habitantes, agrupadas en tres áreas geográficas; Región Golfo, Región Pacífico y Región Centro (Manual Para El Diagnóstico, Tratamiento Y Control De Las Leishmaniosis, 2015). Durante el periodo de estudio se reportaron 3.657 casos, 72% masculino, 28% femenino, la distribución geográfica de esta enfermedad en el país continúa siendo el sureste. De los casos más graves de Leishmaniosis se encuentran en Chiapas es el estado con mayor número de reportes. En cuanto a la mortalidad por esta causa Chiapas tiene un 41% de la mortalidad (Alfaro, M., & Echegoyen, R., 2010) y Tabasco con un 16% (Singh, S., 2006).

Las medidas preventivas y estrategias de control de la Leishmaniosis han estado principalmente enfocadas al tratamiento de la enfermedad, más que a la mitigación de los vectores o el control de la infección en los reservorios, logrando así el contacto entre el hospedante vertebrado y el vector. El reservorio importante para el humano es el canino ya que tiene la capacidad de entrar y salir de la zona selvática y tiene contacto con la familia siendo este un hospedante de suma importancia ya que puede ser punto focal de la infección.

Existe un incremento considerable año tras año, en las tasas de infección en humanos por *Leishmania* spp., y no se ha logrado disminuir los casos de Leishmaniosis. Aun existiendo programas para el control de dípteros transmisores de enfermedades como el dengue (*Aedes Aegypti*) entre otros flebotominos, que generalmente radica dentro de la selva. Estas campañas de Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector, tienen un impacto bajo en la Leishmaniosis, ya que solo se enfocan en el control de los vectores dentro de las localidades, y no en quienes tienen un contacto estrecho con humanos y lo acompañan en sus actividades tanto agrícolas como de esparcimiento, esta situación favorece ciclos de transmisión peridoméstica siendo el humano un hospedante accidental.

La forma natural de la enfermedad involucra principalmente un ciclo selvático en donde la participación de flebotominos y reservorios selváticos como roedores es común, cuando los

humanos invaden o colonizan sitios cercanos a las selvas o cuando los vectores y reservorios expanden sus territorios e invaden áreas urbanas es que ocurre la transmisión a humanos.

6. ANTECEDENTES

Desde hace décadas en nuestro país la Leishmaniosis es una, de varias enfermedades tropicales desatendidas, y que es causada por diferentes especies del protozooario *Leishmania* spp. El cual se transmite por la picadura de hembras hematófagas, de dípteros del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y de Phlebotominae en el Nuevo Mundo (Missawa, N. *et al.*,1924, Maia, C. *et al.*,2016), la enfermedad puede resultar en una de tres formas clínicas principales: Leishmaniosis Cutánea (LC), Leishmaniosis mucocutánea (LMC) y Leishmaniosis visceral (LV) (la forma más grave de la enfermedad, a menudo conocida como kala-azar) entre otras (Gállego, M. *et al.*,2004).

La Leishmaniosis está vinculada a los cambios ambientales, como la deforestación, continuo movimiento de los caninos (*Canis familiaris*) entre zonas con presencia del hábitat de *Leishmania* spp. y la urbanización (Dantas, F., 2009). Se estima que cada año se producen entre 700.000 hasta un millón de nuevos casos y entre 26.000 y 65.000 defunciones (OMS, 2020).

Actualmente se estima que la enfermedad afecta a 12 millones de personas y 350 millones, están en riesgo de infección (Okwor, I. *et al.*,2016). El género *Leishmania* spp., tiene una distribución mundial, y se ha informado en al menos 98 países y 3 territorios dentro de los 5 continentes informaron transmisión de Leishmaniosis endémica, en total, los recuentos de casos oficiales totalizaron más de 58.000 casos LV y 220.000 casos LC por año (Alvar, J. *et al.*,2012).

En América, la distribución geográfica de *Leishmania* spp. se extiende desde el sur Estados Unidos al norte de Argentina, donde las principales especies reportadas son *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. infantum*, *L. peruviana*, *L. pifanoi* y *L. mexicana*, cada uno con un patrón epidemiológico y demográfico diferente (Tolezano, J. *et al.*,2007).

En México, se ha encontrado presente esta enfermedad desde la época precolombina (Martínez, F. *et al.*,2011). La *Leishmania mexicana* tiene el mayor número de informes como agente causante de LC en humanos, en los estados de Campeche, Chiapas, Ciudad de

México, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Pérez, J. *et al.*,2009; Ochoa, D. *et al.*,2012).

En relación al ciclo de vida de este parásito y los reservorios que están involucrados en México han sido poco estudiados. Sin embargo, ha sido posible detectar el ADN de *Leishmania mexicana* en hospedantes silvestres del orden *Chiroptera*, *Didelphimorphia* y *Rodentia* (Campino, L. *et al.* 2018; Quintal, A. *et al.* 2011). También hay informes de casos de LC canina, mediante diagnóstico serológico y parasitológico a partir de las lesiones, en animales de los estados de Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán (Castrejón, O. *et al.* 2009; Arjona, J. *et al.* 2012; Longoni, S. *et al.* 2012), Sin embargo, se desconocen las especies de *Leishmania* spp. que infectan a las especies silvestres y caninos (*Canis familiaris*) en estos estados de la República Mexicana.

Desde 1952, casos de LV humana, han sido reportados en los estados de Chiapas, Guerrero, Puebla, Oaxaca, Morelos y Veracruz de la república mexicana, la prevalencia más alta de la enfermedad se ha informado en el estado de Chiapas y Guerrero (Cruz, L. *et al.*, 1997; Trejo, J. *et al.*,1993; Dorantes, S. 1988; Aguirre, A. *et al.* 1963; Báez, J. *et al.* 1953; Velazco, O. *et al.* 1994; Montalvo, A. *et al.* 1995). En un estudio de caninos (*Canis familiaris*) de caza de otros estados, en México, reveló más casos (Schants, P. *et al.*,2001).

Se ha demostrado una asociación de los caninos (*Canis familiaris*) con Brotes de LV en Brasil, Paraguay y Argentina donde se ha encontrado que la propagación de la enfermedad es la consecuencia de factores socioambientales como la deforestación también como migración de humanos y caninos (*Canis familiaris*) (Margonari, C.*et al.*,2006; Werneck, G. *et al.*,2007; Queiros, P. *et al.*, 2009).

En México, se ha informado un aumento constante de pacientes con Leishmaniosis visceral (LV), especialmente en los estados del sur de la República Mexicana; Chiapas y Guerrero, existe información limitada sobre la Leishmaniosis canina en áreas de LV en México (Cruz, L. *et al.*, 1997; Trejo, J. *et al.*,1993; Dorantes, S. 1988; Aguirre, A. *et al.* 1963; Báez, J. *et al.* 1953; Velazco, O. *et al.* 1994; Montalvo, A. *et al.* 1995).

7. REVISIÓN DE LITERATURA

7.1. Aspectos generales de la Leishmaniosis

En el término la Leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial con gran diversidad de parásitos, reservorios y vectores involucrados en la transmisión. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* spp. y se transmiten a los humanos y animales, a través de la picadura de un insecto de la familia Psychodidae. La presencia de este vector está directamente vinculada a los cambios ambientales, climáticos y socioeconómicos, influyen directamente en su epidemiología. (Panamerican Health Organization, 2019).

Una amplia gama de los mamíferos es susceptible a la infección: desde el hombre, los canidos (domésticos y salvajes), el gato (domésticos y salvajes), los bovinos, los ovinos, los caprinos, los équidos, los roedores, marsupiales (Desachy, F., 2006) y así podemos seguir con una larga lista de los mamíferos afectados, en términos médicos, se les considera una zoonosis, siendo el humano un hospedante accidental.

En el continente americano, se han identificado 15 de las 22 especies de *Leishmania* spp. patógenas para el hombre y cerca de 54 especies diferentes de vectores que están potencialmente involucradas en la transmisión. (Panamerican Health Organization, 2017). Este parásito se transmite mediante la picadura de algunas especies de la subfamilia Phlebotominae conocidos popularmente como "mosca chiclera, jejenes, palomilla, mosquito palha, mosca de la arenilla y papalotilla", entre otros. El vector es activo por la noche, que es cuando inocula el parásito al mamífero a través de su picadura.

La Leishmaniosis constituye un grupo de enfermedades con manifestaciones clínicas muy diversas y las principales variedades clínicas son; cutánea, mucosa y visceral (Montor, J., *et al.* 2016). La Leishmaniosis visceral (kala-azar, complejo de *Leishmaniosis donovani*) se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, anemia progresiva, trombocitopenia, leucopenia con linfocitosis, monocitosis y si no son tratados puede causar la muerte en más del 90% de los casos (Tierney, L., 1999).

La Leishmaniosis mucosa (mucocutánea) conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz y la boca que pueden causar discapacidad grave, mientras que la Leishmaniosis cutánea es la forma más frecuente de esta infección, y produce en su mayoría lesiones ulcerosas que dejan cicatrices de por vida. (Panamerican Health Organization, 2017).

Se registra un promedio de 56.000 casos de leishmaniosis mucocutánea y 3.800 casos de leishmaniosis visceral al año, con una letalidad de 7%. La leishmaniosis mucocutánea se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos. En América latina el 27% de casos de Leishmaniosis mucocutánea se presentan en zonas fronterizas (Panamerican Health Organization, 2019).

7.2.El parásito *Leishmania*

En 1903 William Leishman y Charles Donovan describieron de manera independiente a *Leishmania*, aunque estos parásitos se observaron previamente por David D. Cunningham en 1885 y Peter Borovsky en 1898 (Row, 1912). El parásito fue cultivado por primera vez en 1904 por Leonard Rogers (Thomson & Sinton, 1921).

Este protozoo flagelado está ubicado taxonómicamente de la forma siguiente:

- Reino:** Protista (Haeckel, 1866).
- Subreino:** Protozoa (Goldfuss, 1817).
- Phyllum:** Sarcomastigophora (Honigberg, B, 1963).
- Subphyllum:** Mastigophora (Deising, 1866).
- Clase:** Zoomastigophorea (Calkins, 1909).
- Orden:** Kinetoplastida (Honigberg, 1963).
- Suborden:** Trypanosomatina (Kent, 1880).
- Familia:** Trypanosomatidae (Doflein, 1901).
- Género:** *Leishmania* (Ross, 1903; Lainson & Shaw, 1987).

La *Leishmania* poseen los organelos típicos, presentes en células de eucariontes superiores, con ciertas características exclusivas; contienen una mitocondria única a lo largo de toda la célula, y cuyo ADN está muy condensado en forma de disco ovoide y se le denomina kinetoplasto, está formado por una red compleja de moléculas circulares concatenadas (**Figura 1**). Además, estos parásitos contienen un organelo exclusivo, el glícosoma (relacionado evolutivamente con el peroxisoma), que contiene las enzimas involucradas en varias rutas metabólicas, incluyendo las primeras siete enzimas de la glucólisis (De Souza, 2002; Handman, 1999; Matthews, 2005).

Otro de los rasgos característicos de *Leishmania* y otros tripanosomátidos es la presencia de un citoesqueleto formado exclusivamente por una capa de microtúbulos localizada debajo de la membrana celular (microtúbulos subpelliculares). La bolsa flagelar (región de la que emerge el flagelo) está formada por una invaginación de la membrana plasmática que presenta continuidad con la membrana del flagelo (**Figura 1**). Dicha bolsa constituye, aparentemente, la única región celular donde se presenta actividad endocítica y exocítica (De Souza, 2002; Handman, 1999; Matthews, 2005).

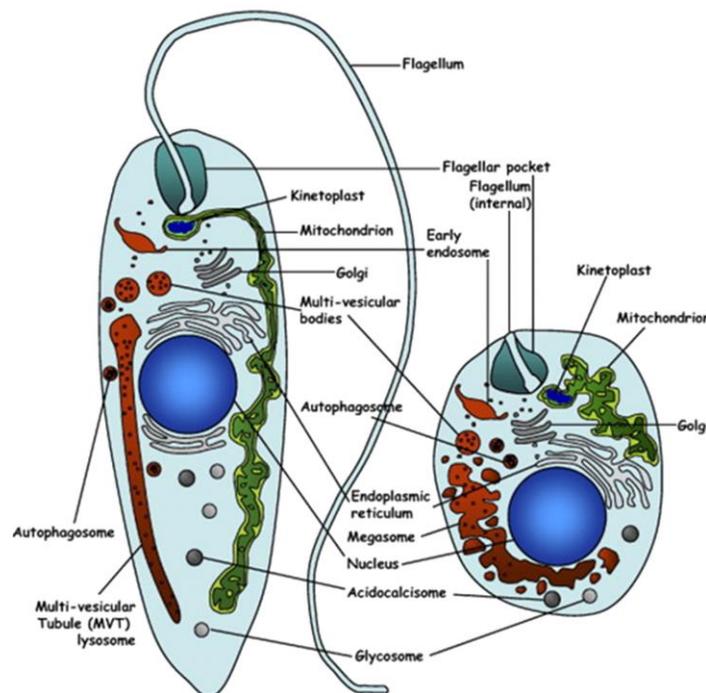


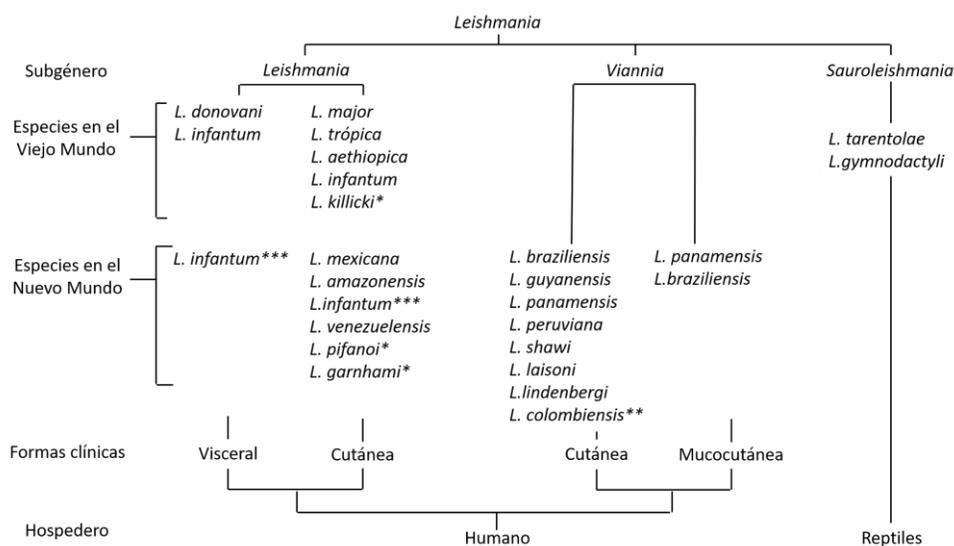
Figura 1. Estructura de Promastigotes de *Leishmania* spp. (Besteiro, S., et al. 2007)

La *Leishmania* se caracteriza por presentar dos estadios de desarrollo principales a lo largo de su ciclo de vida: promastigotes y amastigotes. Los promastigotes son formas alargadas que presentan un tamaño aproximado de 15-20 μm de largo por 1.5 – 3.5 μm de ancho; y poseen un flagelo cuyo tamaño va de 15 – 28 μm (Herwaldt, 1999).

Los amastigotes se caracterizan por su forma redondeada, con un diámetro de 2 – 4 μm , y por la ausencia de flagelo (Murray, *et al.*, 2005).

7.3. Taxonomía y clasificación del parásito *Leishmania*

El género *Leishmania* se divide en tres subgéneros, dependiendo de las partes del intestino del mosquito vector que son colonizadas por el parásito: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Bañuls *et al.* 2002; Bates, 2007) (**Figura 2**). Las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* producen leishmaniosis cutánea y/o visceral tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo, mientras que las especies que se incluyen en el subgénero *Viannia* causan leishmaniosis cutánea y/o mucocutánea sólo en el Nuevo Mundo (**Figura 2**). Por su parte las especies que pertenecen al subgénero *Sauroleishmania* no son patógenas para los mamíferos, pues infectan solo reptiles.



*El estatus de especie continua bajo discusión, **La posición taxonómica se encuentra bajo discusión, ***En el Nuevo mundo es conocida como *L. chagasi*

Figura 2. Clasificación de *Leishmania* y formas clínicas de leishmaniosis que produce cada especie (Bañuls, A., *et al.* 2002; Bates, P., 2007).

7.4. Reservorios de *Leishmania*

Un número amplio de organismos vertebrados, además del humano, pueden fungir como reservorios de *Leishmania* spp., lo que facilita la distribución, permanencia, infección y transmisión del parásito (Ashford, R., 1996; Shaw, J., 1988). Por lo general cada especie de *Leishmania* spp. tiene un reservorio principal que puede ser cualquier mamífero donde el protozoo permanece naturalmente y constituye una fuente de infección para el humano y otros animales domésticos. Pero otros mamíferos que habitan la misma zona pueden ser también infectados, constituyendo un reservorio intermediario y/o reservorios menores o accidentales, y mucho de estos se encuentran en contacto con los humanos (Rojas, M., 2004).

Los caninos domésticos (*Canis familiaris*) son el reservorio principal de *L. infantum*, aunque pueden también ser infectados por *L. tropica*, *L. major* y *L. braziliensis*. En algunas áreas alrededor del mar mediterráneo y al norte de Brasil, la mayoría de los perros domésticos y ferales son infectados con *Leishmania* en algún momento de su vida (Ashford, 1996; Shaw, 1988).

Varias especies de roedores y marsupiales son infectados por *L. mexicana* y *L. braziliensis* en Nuevo Mundo, la transmisión de estas especies de *Leishmania* a humanos que cohabitan con los roedores y marsupiales infectados en zonas boscosas, selváticas o inclusive en su propio hogar, es común (Ashford, 1996; Shaw, 1988).

7.5. Estructuración genómica de *Leishmania*

Los integrantes de la familia Trypanosomatidae son considerados en un nivel intermedio entre bacterias y levaduras, desde una perspectiva evolutiva, en su homología de los genes que codifican las subunidades pequeñas de sus RNAr (Sogin, M., *et al.* 1986).

Al igual que la mayoría de los eucariotas, los tripanosomátidos poseen dos genomas, un ADN genómico (ADNg) localizado en el núcleo celular, que se encarga de la replicación del material genético del parásito, y un ADN extra cromosómico situado en la única mitocondria que se replica de manera independiente, conocido como ADN del kinetoplasto (ADNk) (Alvar, J., 2001).

El ADNk constituye del 10 al 30% del ADN total de la célula y está formado por numerosas moléculas de ADN circulares concatenadas entre sí como si fueran una red de círculos y que dependiendo de su tamaño reciben el nombre de maxicírculos y minicírculos, en donde se encuentran genes que codifican RNA ribosomal (RNAr) y RNA guías (RNAg) estos son importante para la transcripción de los RNA mensajeros (RNAm) mitocondriales (Mamani, Z., 1999).

El kinetoplasto consta de alrededor de 50 maxicírculos que varían en tamaño entre 30 – 40 kb, los minicírculos son más numeroso existiendo de 10.000 a 20.000 por kinetoplasto con un tamaño de 250 a 2.500 pb (Benne, R., 1994; Simpson, L., *et al.* 1995), en el caso particular del género *Leishmania*, los pares de bases de los minicírculos oscilan entre 600 a 800 pb, estos presentados en regiones, una conservada y una variable, la conservada es de 120 pb y la variable de 600 pb (Noyes, H., *et al.*, 1998).

Debido a la gran cantidad de repeticiones, los minicírculos han servido para el desarrollo de métodos de diagnóstico basado en la amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Ravel, S., *et al.* 1995; Avilés, H., *et al.* 1999). Esto es importante porque aun habiendo un solo ejemplar de este parásito en una muestra de sangre es posible detectarlo, aumentando la sensibilidad de esta prueba diagnóstica PCR (Rodgers, M., *et al.* 1990; Noyes, H., *et al.*, 1998).

Los genes que codifican las proteínas mitocondriales están incompletos, tienen que ocurrir varias inserciones y deleciones de residuos de uridina, este proceso esta mediado por RNA guía (RNAg), mismo que se encuentra codificado en los maxicírculos y minicírculos, y que serán modificados post transcripcionalmente por poliuracilación en su extremo 3´ y catalizan la corrección en dirección de 3´ a 5´, este mecanismo en los tripanosomátidos es una forma de control traduccional que se usa como método de regulación de la expresión génica (Beene, 1994; Moreno, S., 2000).

7.6. Ciclo biológico de *Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* son transmitidos por insectos hematófagos de la familia Psychodidae y la subfamilia Phlebotominae. En el Continente Americano, el género

Lutzomyia (Phlebotominae) es el género más importante, con más de 400 especies identificadas; sin embargo, poco más de 50 son consideradas especies potenciales de vectores o están involucradas en la transmisión de las diferentes especies de *Leishmania* en el Continente Americano (Panamerican Health Organization, 2017).

La *Leishmania* spp. muestra un ciclo biológico heteroxeno en el cual participan hospedantes invertebrados que son dípteros, así como un amplio rango de mamíferos (Alexander, J., *et al.* 1992).

Los promastigotes procíclicos residen en el aparato digestivo de la mosca de la arena (Phlebotominae), donde se replican repetidamente por fisión binaria. Después de un tiempo se diferencian en promastigotes metacíclicos, que es la forma infectante de este parásito (Desjeux, P., 2004; Murray, H., *et al.*, 2005).

Los amastigotes se caracterizan por su forma redondeada, con un diámetro de 2 – 4 μm , y por la ausencia de flagelo (aunque en realidad poseen un flagelo muy corto que no alcanza a sobresalir del cuerpo celular). Tienen la capacidad de replicarse dentro células fagocíticas incluso fagolisosomas en el hospedante mamífero (Desjeux, P., 2004; Murray, H., *et al.*, 2005).

El protozoo estando dentro del vector, atraviesa por tres estadios principales, el primero de ellos ocurre desde la toma de sangre parasitada (día 0) hasta el día 2. Todo este desarrollo se lleva a cabo en la parte media del intestino, donde se forma la llamada membrana peritrófica la cual tiene la ingesta de sangre, en esta etapa donde los amastigotes ingeridos, se transforman en promastigotes procíclicos (Killick, R., 1979).

La metacicloogénesis constituye un aspecto vital para la transmisión de *Leishmania*: consiste en un proceso de transformación y multiplicación de los promastigotes no infectivos, promastigotes procíclicos de 6 – 12 horas post ingestión, nectomonas 36 – 48 horas post ingestión, finalmente los paramastigotes y leptomonas = haptomonas, que se transformarán a formas infectivas de promastigotes metacíclicos, que poseen diferencias bioquímicas y funcionales (Nieves, E., *et al.*, 2007; Bates, P., 2008).

El parásito debe adherirse al intestino del insecto para iniciar su ciclo de desarrollo, esto asegura que la infección se establezca. La adhesión del parásito es fundamental y se han

descrito varias formas, por ejemplo, existe una adhesión donde los promastigotes procíclicos, se unen a través de las microvellosidades del epitelio (por la inserción flagelar y/o adherencia del cuerpo de los promastigotes), para eso se necesita el lipofosfoglicano (LPG) (Pimenta, P., *et al.*, 1994; Kamhawi, S., *et al.*, 2000), El LPG protege a la *Leishmania* de toda enzima proteolítica y es de gran ayuda al promastigote procíclico en la adhesión al intestino del vector, esta función se pierde una vez en la etapa de promastigote metacíclico, debido a transformaciones en los azúcares terminales y con cambios conformacionales de la molécula, y es así como migra a la probóscide (Turco, S., *et al.*, 2001; Muskus, C., *et al.*, 2002).

En las leptomonas = haptomonas, durante la formación de hemidesmosomas (estructuras de unión celular que conectan las células epiteliales a la membrana basal) a través del contacto del parásito con el epitelio quitinizado (Killick, R., *et al.*, 1974).

Al mismo tiempo existen otras agrupaciones: un tercer tipo representado por las uniones a una matriz del gel (Lawyer, P., *et al.*, 1987; Walters, L., *et al.*, 1993; Stierhof, Y. *et al.*, 1999), el cuarto ejemplo es, donde el parásito se adhiere entre sí por el flagelo y/o el cuerpo celular del parásito, formando rosetas (Nieves, E., 2000), las fuerzas de atracción y repulsión de las unidades aniónicas que se encuentran presentes en la superficie de los promastigotes controlan las uniones (Walters, L., *et al.*, 1993).

Durante el último estadio a las 120 horas post-ingestión, el intestino evacua su contenido sanguíneo, los huevos completan su desarrollo y da inicio a la ovoposición, al mismo tiempo se lleva a cabo una infección masiva por haptomonas del aparato digestivo anterior, los paramastigotes y se agrupan evitando el paso de sangre al intestino medio, los promastigotes metacíclicos migran al esófago y faringe, facultado al insecto para transmitir al parásito (Eldridge, B., *et al.*, 2000).

La forma metacíclica del parásito, se ubica en la parte anterior del tracto digestivo, en la proximidad de la probóscide, estando listo para ser inoculado en la siguiente ingesta, cerrando de esta forma el ciclo biológico (Molyneux, D., *et al.*, 1987).

El vector al momento de picar a un hospedante mamífero para alimentarse, inoculan en la dermis entre 10 y 200 promastigotes, un gran número de estos son destruidos por los

leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos; otros se establecen en receptores de los macrófagos dérmicos para ser fagocitados (Klaus, S., *et al.*, 1999).

Aun teniendo evidencia por la técnica de video microscopía donde se ha encontrado la presencia de *Leishmania* en las células dendríticas y los fibroblastos, no se conoce todavía el mecanismo y las moléculas involucradas en la invasión y supervivencia de los amastigotes en estas células dentro del hospedante mamífero (Handman, E. *et al.* 2002).

Está comprobado que la *Leishmania* también puede ser transmitida a través de jeringas de usuarios de drogas intravenosas, mediante transfusión sanguínea, o de manera congénita de madre a hijo. Sin embargo, estas formas de contagio son muy pocos comunes (Desjeux, P., 2004; Herwaldt, B., 1999; Murray, H., *et al.*, 2005).

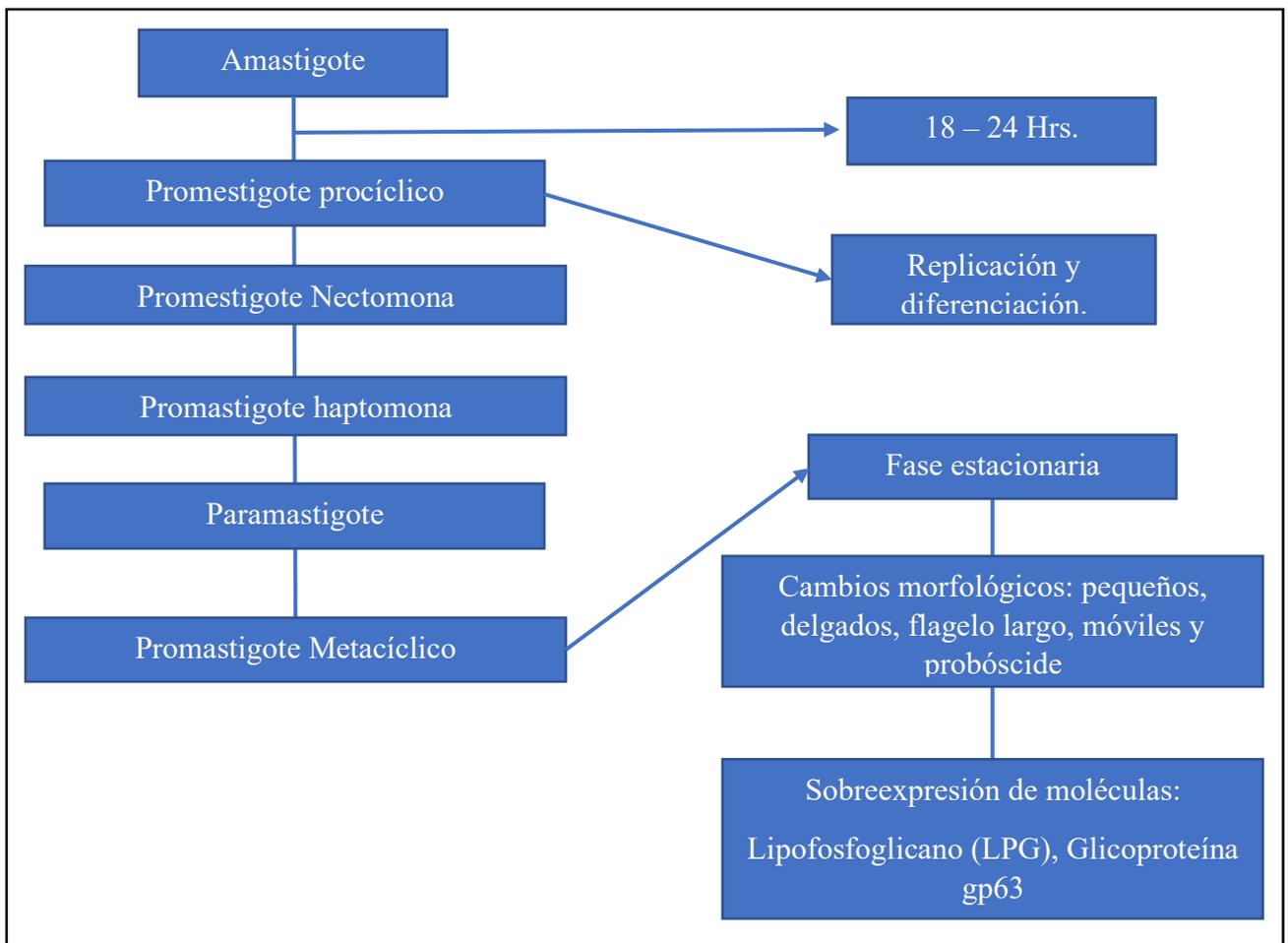


Figura 3. La metaciclo de *Leishmania* ocurre en el interior del vector, por el cual los promastigotes se vuelven altamente infectivos y resistentes al sistema inmune (Turco, S., *et al.*, 2001; Muskus, C., *et al.*, 2002)

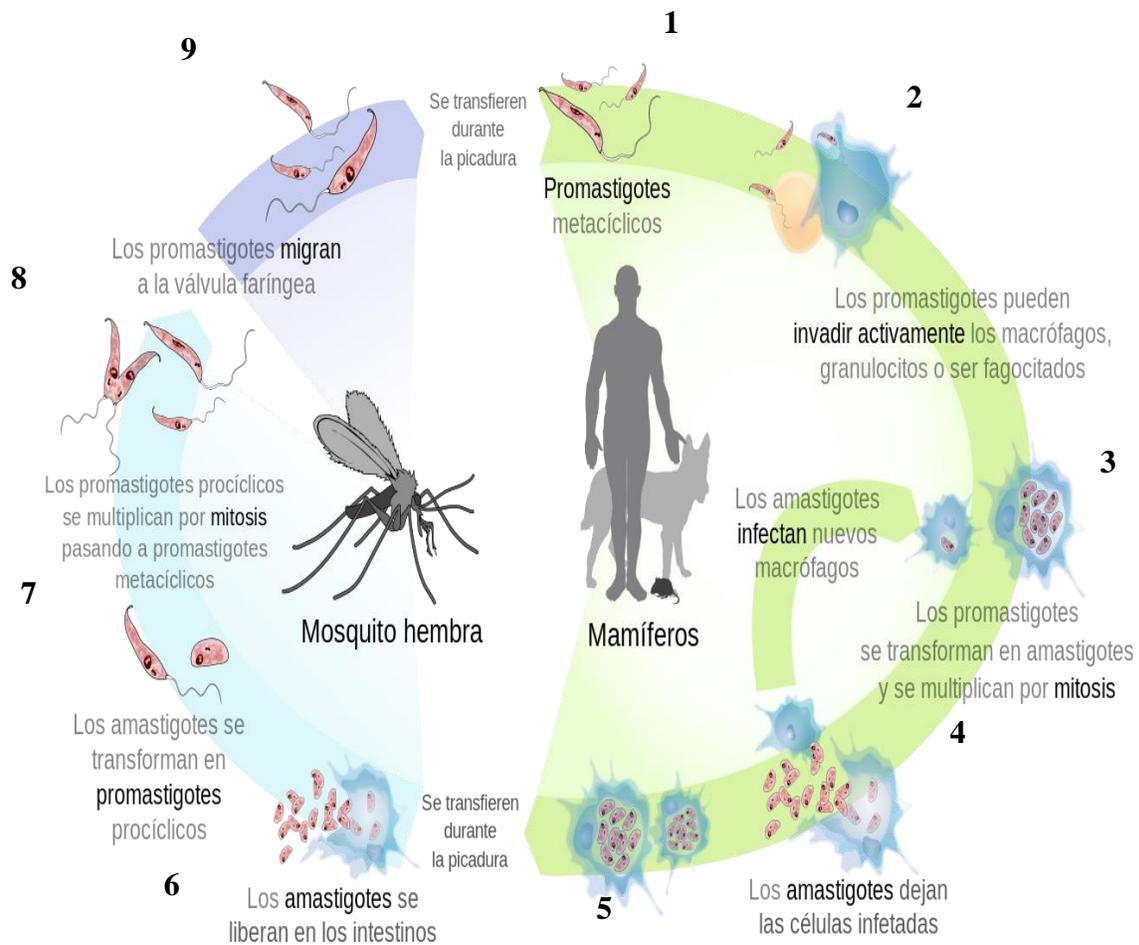


Figura 4. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Imagen elaborada por Mariana Ruiz Villarreal)

El ciclo biológico inicia cuando el vector se alimenta de la sangre de un mamífero infectado, transmitiéndole promastigotes metacíclicos a través de la picadura (1). Estas formas son fagocitadas por los macrófagos (2), dentro de las fagolisosomas se diferencian a amastigotes (3), los cuales se replican repetidamente por fisión binaria hasta que lisan al macrófago (4). Los amastigotes pueden entonces invadir otras células del hospedante (5). Cuando el vector pica aun mamífero infectado, puede tomar amastigotes presentes en la sangre y estos se liberan en los intestinos del mosquito vector (6), en el intestino del mosquito vector se transforman en promastigotes procíclicos, formas altamente replicativas (7). Los promastigotes procíclicos se unen a la pared del intestino medio para luego liberarse pasando a promastigotes metacíclicos (8). Posteriormente los promastigotes migran a la válvula faríngea del mosquito vector siendo ya promastigotes infectivos (9).

7.7.El vector

Los flebotómíneos (del griego *phlebos*, vena y *tomos*, cortar) son pequeños insectos categorizados taxonómicamente dentro del orden Díptera, suborden Nematóceras, familia Psychodidae (Newman, 1834), subfamilia Phlebotominae (Rondani, 1856).

La *Lutzomyia* alberga a la mayoría de flebotominos en el continente americano, encontrándose en mayor cantidad en la región neotropical. Existen informes de 14 fósiles de *Lutzomyia* preservados en ámbar en depósitos centroamericanos, calculándose su edad mínima en 26 millones de años (Oligoceno tardío y Mioceno temprano) (Cáceres, A., *et al.*, 2002)

En el humano el vector comprobado que provoca Leishmaniosis son las especies del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y Phlebotominae en el Nuevo Mundo, estos insectos son dípteros pequeños, usualmente de 2 a 3 mm de largo, densamente cubiertos con pelos finos, que presentan patas relativamente largas y delgadas (Bates, P., 2007; Williams, P., 1993).

El ciclo de vida de la hembra comienza cuando depositan sus huevos en microhábitats húmedos y ricos en materia orgánica, los huevos larvas y pupas no tienen tiempo precisos para el desarrollo de los estadios, debido a que dependen principalmente de la temperatura ambiental de la zona, a altas temperaturas se acortan los periodos (Sharma, U., *et al.* 2008; WHO, 2010).

En el ciclo biológico de la Leishmaniosis intervienen distintos hospedantes, en el caso del vector, como ya se indicó son dípteros hematófagos pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae (Díptera, Psychodidae), solo dos géneros son de interés médico, los flebotominos que transmite la enfermedad en América (Bejarano, E., *et al.* 2019) y el género Phlebotominae que transmite la enfermedad en Eurasia (Boelaert, M., *et al.* 2000).

Se ha descrito que en las hembras del vector ingieren azúcar (melaza producida por áfidos) la cual no solo la usan como fuente de energía si no que es necesaria para el desarrollo de *Leishmania* en su aparato digestivo, mientras el vector se alimenta de un mamífero, la saliva del insecto y los proteofosfolípidos del parásito son introducidos en el animal, lo que se cree que juega un papel importante en el establecimiento de la infección de *Leishmania* en la piel del mamífero (Sharma, U., *et al.* 2008; WHO, 2010).

Los sitios de pernocta del vector en el transcurso del día deben ser lugares frescos y húmedos, dentro de su hábitat existen abundantes sitios con esas características, como habitaciones, letrinas, bodegas, establos, cuevas, fisuras en paredes, vegetación densa, orificios en los árboles, madrigueras de roedores y otros mamíferos, nidos de aves y termiteros (Dinesh, D., *et al.*, 2001).

En México se ha demostrado que *Lutzomyia olmeca* es el vector primario de *Leishmania mexicana* (Sánchez, L., *et al.*, 2010). Sin embargo, existe evidencia que indica que *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia shannoni* también contribuyen a la transmisión del parásito en el sureste del país (Pech, A., *et al.*, 2010).

7.8. Morfología de Phlebotominae (*Lutzomyia* spp.)

Estos insectos son holometábolos (metamorfosis completa), por lo que pasan por diferentes estados de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Es precisamente el estadio adulto el mejor conocido, ya que como es el caso de otros dípteros con larvas terrestres, los estadios inmaduros son difíciles de encontrar en el campo.

Los especímenes adultos tienen un tamaño de 2-5 mm de longitud, con el cuerpo, alas y patas cubiertos de pelos finos (cortos y largos), observándose también escamas pequeñas (Bates, P., 2007; Williams, P., 1993).

El color alterna desde un café claro a pardo, pero es la porción dorsal del tórax la que muestra mayor diversidad de coloración, esta particularidad es muy útil para la identificación taxonómica de algunas especies (**Figura 5**), los ojos compuestos están separados uno de otro, las patas y el aparato bucal son largos y delgados, las alas no presentan patrones de coloración y son sostenidas casi erectas aproximadamente a 45° del abdomen, terminando en punta. Los machos de *Lutzomyia* se diferencian de las hembras por presentar genitales externos grandes y articulados, para la cópula (Cáceres, A., *et al.*, 2002).

La cabeza está articulada a la parte anterior del tórax. Es ligeramente piriforme en vista frontal, aplanada en sentido antero-posterior, con las piezas bucales dirigidas hacia abajo, los

ojos compuestos son más o menos redondos y ocupan gran parte de la superficie de la cabeza (Figura 5) (Galati, B., *et al.*, 1995).

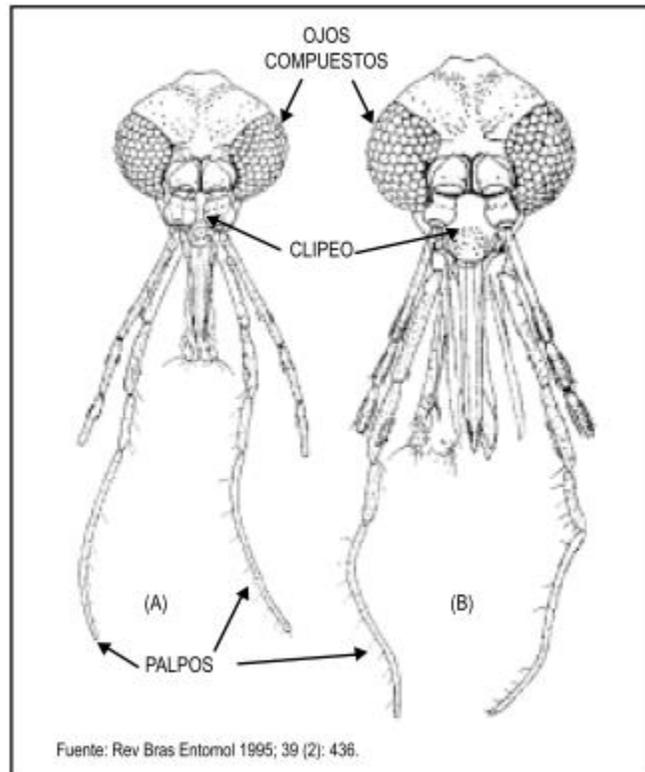


Figura 5. Cabezas de *Lutzomyia* macho (A) y hembra (B)



Figura 6. *Lutzomyia* spp., tomando una ingesta sanguínea. Fuente: Wilson, 2014

7.8.1. El adulto

Los flebótomos adultos en comparación con otros dípteros, son más pequeños e inferiores de longitud que algunas especies de dípteros, dan una apariencia frágil.

Las hembras presentan una boca especializada para la ingestión de sangre que presenta un fascículo con seis estiletos, sus ojos generalmente oscuros varían en tamaño (Young, D., 1979)

Las hembras son las únicas que pican a los vertebrados para alimentarse de sangre, por lo que se les consideran antropófilas o zoófilas, al momento de la picadura es que pueden transmitir los agentes patógenos como los causantes de la leishmaniosis y diversos arbovirus, por lo general estas especies de *Lutzomyia* poseen una actividad crepuscular (antes del amanecer) y nocturna (después del atardecer) en un lapso de tiempo desde las 16:00 hasta las 07:00 horas, también se encuentran activas durante el horario de luz (de 7:30 a 18:45) (Young, D., *et al.* 1992).

El color del cuerpo tanto en machos como hembras (**Figura 7**), varía desde una café claro hasta un color negro, esto dependiendo de la especie, la cabeza de implantación inferior le da un aspecto como de giba (Eldridge, B., *et al.*, 2000).



Figura 7. *Lutzomyia* spp., ingiriendo sangre. Fuente: Wilson, 2014

7.9. Interacción del parásito dentro del vector

En la naturaleza la transmisión y propagación de *Leishmania* spp., esto engloba a la triada epidemiológica misma que tiene tres componentes: el agente externo, un hospedante susceptible y un ambiente que reúne el hospedante y el agente (López, J., 2012). El ejemplo claro es cuando el parásito se transfiere del mamífero al insecto, existen sustancias presentes en este último que favorecen el paso de amastigote a promastigote, situación que es inhibida en el mamífero, los diferentes tipos de *Leishmania* spp., se asocian en tres grupos de acuerdo con sus patrones de desarrollo en el intestino dentro del vector (Brun, R., *et al.*, 1976; Lainson, R., *et al.*, 1987).

Los criterios de clasificación que se utilizaron fueron los introducidos por Ryan Lainson en 1979, donde el criterio que se siguió fue similar al propuesto por Hoare, en donde se utiliza para la clasificación de Tripanosomas de mamíferos en las secciones salivarías y estercolaria (Hoare, C., *et al.*, 1964).

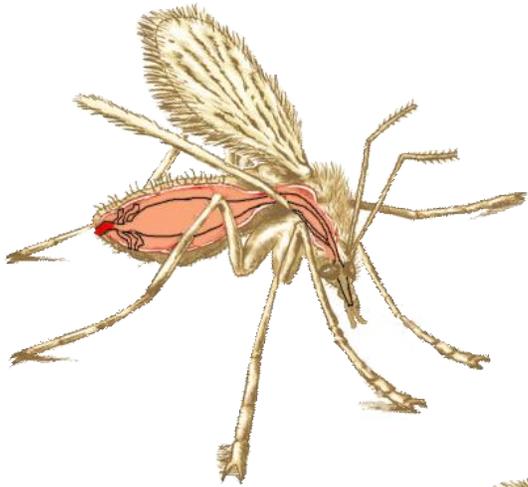
Como lo determina y estipula el criterio son tres secciones en el caso de *Leishmania*; la Hipopilaria, Peripilaria y Suprapilaria (**Figura 8**).

En la sección Hipopilaria agrupa a flagelados primitivos, desarrollándose en las partes posteriores del tubo digestivo, píloro, ilion y recto, esto comprende a especies sin riesgo para la salud del humano, agrupadas en el género *Sauroleishmania*, donde sus hospedantes son reptiles, el método de contagio a estos reptiles es por ingestión de los insectos infectados (Lainson, R., 1982).

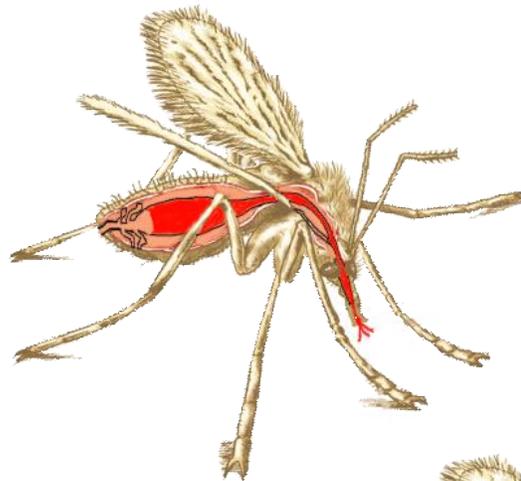
En la sección de Peripilaria, están donde la infección se presenta en las células macrófagas de piel y vísceras del mamífero en forma de amastigote, la diferencia entre las demás *Leishmania*, es que esta se desarrolla en tracto digestivo posterior, en donde establece una infección inicia en el píloro, donde los promastigotes se unen a la pared cuticular donde migran hasta alcanzar el intestino medio e intestino anterior, el método de transmisión es la picadura (Lainson, R., 1982).

En la sección Suprapilaria, están las Leishmaniosis pertenecientes a distintos complejos que afectan a los mamíferos (humanos y animales), como; *L. mexicana*, *L. hertigi*, *L. tropica*, *L. major* y *L. donovani*, estas carecen de la capacidad para adherirse a las porciones posteriores

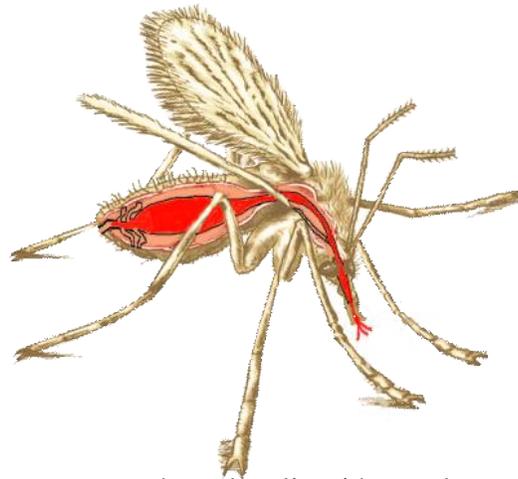
del intestino, donde su desarrollo se limita a la porción anterior y media del intestino, la transmisión es mediante la picadura (Lainson, R., 1982).



Hipopilaria
Sauroleishmania
Hospedador: Reptiles
Localización: Viejo Mundo



Peripilaria
L. adlei, *L. tarentolae* y *L. brasiliensis*
Hospedador: Reptiles y mamíferos
Localización: Nuevo y Viejo Mundo



Suprapilaria
L. mexicana, *L. hertigi*, *L. donovani*, *L. tropica* y *L. major*
Hospedador: Mamíferos
Localización: Nuevo y Viejo Mundo

Figura 8. Clasificación de *Leishmania* spp. según su localización en el vector

(Adaptado de Lainson, R., *et al.*, 1987)

Cumple un papel importante la localización del parásito dentro del vector ya que este determina la forma en la transmisión del hospedante vertebrado (Sádlova, J., *et al.*, 1999).

7.10. Epidemiología

La Leishmaniosis está presente en los cinco continentes y es endémico en 102 países, se calcula que cerca de 350 millones de personas viven en regiones en las que existe el riesgo de adquirir la infección, donde registran 1.3 millones de casos nuevos de Leishmaniosis y de 20.000 a 30.000 muertes cada año (OPAS, O. D. S., 2019).

En el Continente Americano se registra un promedio de 56.000 casos de Leishmaniosis cutánea y mucosa y 3.800 casos de Leishmaniosis visceral al año, con una letalidad media de 7%. La Leishmaniosis cutánea se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos, entre ellos México, y la Leishmaniosis visceral en 12 donde también se encuentra México, en esta Región el 27% de los casos de Leishmaniosis cutánea se presentan en zonas fronterizas (OPAS, O. D. S., 2019).

En 2017 dentro del Sistema Regional de Informaciones de Leishmaniosis de la OPS/OMS (SisLeish-OPS/OMS, 2017) donde se realizan los reportes de esta enfermedad que es endémica y de gran importancia epidemiológica en Nicaragua, Venezuela, Bolivia, Costa Rica, Honduras, Panamá, Ecuador, México, Guatemala, Argentina y Paraguay (**Figura 10**).

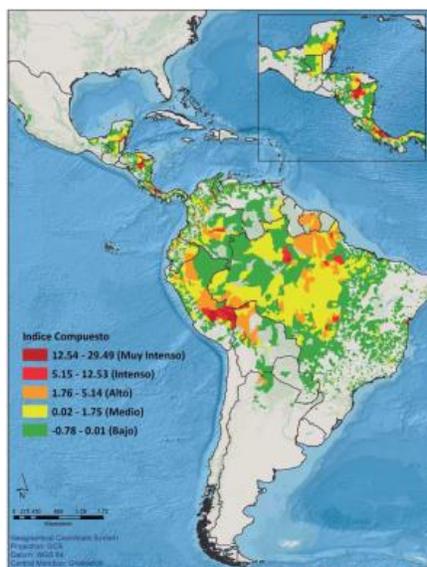


Figura 9. Estratificación de riesgo de Leishmaniosis cutánea y mucosa por segundo nivel administrativo subnacional, Américas, 2017. Fuente: SisLeish-OPS/OMS – Datos

disponibles por los Programas de Leishmaniosis de los países, acceso el 01 de diciembre del 2018.

Se considera según la OMS que existen tres ciclos diferentes de transmisión: el selvático, el doméstico-rural y el doméstico-urbano dentro del Continente Americano, dentro del ciclo selvático, la infección humana ocurre cuando el hombre se introduce en el bosque o la selva y es picado ahí por el vector infectado, aquí el hombre es un hospedante accidental que no interviene en el ciclo de transmisión, y los reservorios son los animales selváticos. En los ciclos doméstico-rural y doméstico-urbano los vectores llegan al peri-domicilio, ingresan a las viviendas y transmiten la infección al núcleo familiar, con mayor incidencia en los niños (OPAS, O. D. S., 2019).

Algunas evidencias, aún no confirmadas, sugieren que tanto el hombre como los animales de comportamiento sinantrópico y los animales domésticos podrían participar como reservorios del ciclo doméstico-rural. Por otro lado, estudios muestran que el perro es el principal reservorio en la transmisión de la Leishmaniosis visceral en ambientes urbanos (ciclo doméstico-urbano) (OPAS, O. D. S., 2019).

El aumento dentro la sociedad de casos de VIH ha hecho que las personas sean más susceptibles a la infección por *Leishmania* (Alvar, J., *et al.*, 2008; Dedet, J., *et al.*, 2000), y esto ha logrado extenderse a las áreas remotas y rurales que constituyen zonas endémicas para la Leishmaniosis, haciendo que sea un problema que agilice la expansión una coinfección VIH-Leishmaniosis, obligando a implementar programas eficientes para el control de Leishmaniosis visceral (WHO, 2010).

La *Leishmania* y otros tripanosomátidos son importantes en su biología molecular por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, diferentes a otros organismos eucariontes, con la transcripción policistrónica (RNA que es el producto de la transcripción de varios genes dispuestos en tándem, normalmente de función relacionada. Son típicos de procariontes y se forman en la transcripción de un operón) y el *trans*-splicing (es una forma especial de procesamiento de RNA donde los exones de dos transcripciones de RNA primarias diferentes se unen de extremo a extremo y se ligan) (Campbell, D. *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo, S., *et al.*, 2010).

La Leishmaniosis cutánea es considerada un problema de salud pública en México, pues hasta el 2005 había sido reportada en 22 entidades federativas de las 32 que existen (Andrade, F., *et al.* 2005; Sánchez, G., *et al.*, 2001). Estos casos han ido aumentando en la actualidad debido al desplazamiento y establecimiento de asentamientos de humanos dentro de la selva donde es común la presencia el vector de la Leishmaniosis (Sánchez, L., *et al.*, 2010).

Se han reportado y registrado un gran número de casos de Leishmaniosis visceral principalmente en Chiapas, donde la variedad causante de esta Leishmaniosis visceral en México es; *L. infantum*, especie conocida en el Nuevo Mundo como *L. chagasi* (Monroy, A., *et al.*, 2000).

7.11. Leishmaniosis canina

La participación de los perros domésticos como reservorios potenciales de la Leishmaniosis han sido investigada desde el descubrimiento de esta enfermedad en América. El primer perro infectado fue descrito por Pedroso en Brasil en 1913 y correspondió a una infección por *L. donovani* (Pedroso, A. M., *et al.*, 1913).

Debido a su elevada susceptibilidad a la infección por *Leishmania* spp. y por su residencia común en zonas endémicas, así como por sus frecuentes actividades como cazador, depredador solitario o simplemente como acompañante del hombre en sus actividades selváticas, el canino corre un gran riesgo de infectarse con *Leishmania* spp.

Históricamente la enfermedad se ha diagnosticado en Estados Unidos de Norte América, donde la mayoría de los casos que se diagnostican en animales que retornan de países mediterráneos donde la enfermedad es enzoótica (Bravo, L., *et al.*, 1993).

En la patogenia del perro y del humano existe un mecanismo inmunopatogénico muy importante en el desarrollo de la enfermedad. Debido al desarrollo de inmunocomplejos, éstos se depositan en distintos órganos, como el bazo, hígado, riñón, y de manera sistémica en los vasos sanguíneos, propiciando distintos cuadros clínicos característicos de la enfermedad (Biagi, F., *et al.* 1983).

El perro es el principal reservorio de *L. infantum* en el Medio Oriente y la cuenca mediterránea, así como de *L. chagasi* en América del Sur (Campino, L., *et al.*, 2000). De igual forma, como en el caso de los humanos, la infección puede no causar signos en el corto

plazo, que también ocurre en algunos caninos (Ferrer, L., *et al.*, 1999), sin embargo, los signos clínicos de la enfermedad se desarrollan con frecuencia.

El periodo de incubación en la LC es variable. Se notifican intervalos entre dos y 25 meses en formas subclínicas de LC experimental (Slappendel, R. J., *et al.*, 1988; Oliveira, G. G. *et al.*, 1993).

En animales infectados de forma natural presenta periodos asintomáticos prolongados, (Santos, G. M., *et al.*, 2000). En Europa la LC representa un serio problema y se calcula que alrededor de siete millones de perros se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad (Reithinger, R., *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Distribución de las especies de *Leishmania*, las formas clínicas, vector y reservorio comprobado o sospechoso en la transmisión de esta enfermedad en los países del Continente Americano. Fuente: WHO - TRS 949 2010 - adaptación - Leyenda: LC - Leishmaniosis cutánea LM - Leishmaniosis mucosa LCD - Leishmaniosis cutánea difusa LV - Leishmaniosis visceral * Caracterización realizada por el “Laboratorio de Pesquisa em Leishmaniose - IOC-FIOCRUZ-Brasil”, ** Identificación y Taxonomía realizada por el Servicio de Entomología del Ministerio de Salud de Guatemala.

País	<i>Leishmania</i> spp.	Forma Clínica	Vector (probado o sospechoso)	Reservorio Animal (probado o sospechoso)
Argentina	<i>L. guyanensis</i>	LC	Desconocido	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	LC	Desconocido	Desconocido
	<i>L. infantum</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> <i>Lu. neivai</i> <i>Lu. migonei</i> <i>Lu. Longipalpis</i>	Perro
		LV		Perro
Belice	<i>L. braziliensis</i>	LC	<i>Lu. ovallesi</i>	Desconocido
	<i>L. mexicana</i>	LC	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	<i>Heteromys</i> spp., <i>Nyctomys</i> spp., <i>Otodylomys</i> spp., <i>Sigmodon</i> spp., <i>Oryzomys</i> spp.

Bolivia	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM.	<i>Lu. nuneztovari</i> <i>anglesi</i> <i>Lu. carrerai</i> <i>carrerai</i> <i>Lu. llanosmartinsi</i> <i>Lu. shawi</i> <i>Lu. ayrozai</i> <i>Lu. Yucumensis</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. guyanensis</i>	LC, LCD LV LC	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. shawi</i>	<i>Oryzomys</i> spp. Perro <i>Choloepus</i> spp., <i>Didelphis</i> spp., <i>Tamandua</i> spp.
	<i>L. lainsoni</i>	LC	<i>Lu. nuneztovari</i> <i>anglesi</i>	<i>Agouti paca</i>
	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i> <i>Lu. whitmani</i>	<i>Choloepus</i> spp. <i>Tamandua</i> spp. <i>Didelphis</i> spp., <i>Proechimys</i> spp. <i>Proechimys</i> spp. <i>Oryzomys</i> spp. <i>Wiedomys</i> spp.
Brasil	<i>L. amazonensis</i>	LC	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. longipalpis</i>	<i>Oryzomys</i> spp. <i>Wiedomys</i> spp.
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> <i>Lu. intermedia</i> <i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. complexa</i> <i>Lu. neivai</i> <i>Lu. edwardsi</i> <i>Lu. migonei</i>	Perro, <i>Rattus rattus</i> , <i>Akodon arviculoides</i> <i>Bolomys</i> spp. <i>Nectomis</i> spp. <i>Thrichomys</i> spp.
	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. cruzi</i> <i>Lu. almerio</i> <i>Lu. salesi</i>	Perro, <i>Lycalopex</i> <i>vetulus</i> , <i>Cedocyon thous</i> <i>Didelphis albiventris</i>
	<i>L. lainsoni</i> <i>L. shawi</i>	LC LC	<i>Lu. ubiquitalis</i> <i>Lu. whitmani</i>	<i>Agouti paca</i> <i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes</i> <i>satanus</i> , <i>Nasua nasua</i> , <i>Bradypus</i> <i>tridactylus</i> <i>Choloepus didactylus</i> <i>Dasypus novemcinctus</i>
	<i>L. naiffi</i>	LC	<i>Lu. squamiventris</i> <i>Lu. paraensis</i> <i>Lu. amazonensis</i>	

	<i>L. lindenbergi</i>	LC	<i>Lu. ayrozai</i> Desconocido	Desconocido
Colombia	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. spinicrassa</i> <i>Lu. colombiana</i> <i>Lu. pia</i> <i>Lu. towsendi</i>	Perro, <i>Akodon spp.</i> , <i>Micoureus demerarae</i> , <i>Melanomys caliginosus</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Didelphis marsupialis</i> .
	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. yuilli</i>	Perro <i>Choloepus hoffmanni</i> <i>Metachirus nudicaudatus</i> , <i>Didelphis marsupialis</i> , <i>Coendou spp.</i>
	<i>L. guyanensis</i>	LC, LM	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. longifl ocosa</i>	Desconocido
	<i>L. colombiensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. infantum</i>	LC LC, LCD LC LV	<i>Lu. hartmanni</i> <i>Lu. fl aviscutellata</i> <i>Lu. columbiana</i> <i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. Evansi</i>	Desconocido Desconocido <i>Didelphis marsupialis</i> Perro <i>Didelphis marsupialis</i>
Costa Rica	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. trapidoi</i>	<i>Bradypus griseus</i> , <i>Choloepus hoffmanni</i> , <i>Heteromys desmarestianus</i> Desconocido
	<i>L. mexicana</i>	LC, LM,	<i>Lu. olmeca olmeca</i> , <i>Lu. olmeca bicolor</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. infantum</i>	LCD LC, LM LC LV	<i>Lu. youngi</i> <i>Lu. youngi</i> <i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. Evansi</i>	Desconocido Desconocido Perro <i>Didelphis marsupialis</i>
Ecuador	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	Desconocido	Desconocido
	<i>L. panamensis</i>	LC	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. hartmanni</i> <i>Lu. gomezi</i>	<i>Potus fl avus</i> , <i>Tamandua tetradactyla</i> , <i>Sciurus vulgaris</i> <i>Choloepus didactylus</i>
	<i>L. guyanensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i>	LC LC, LCD LC, LCD	Desconocido <i>Lu. fl aviscutellata</i> <i>Lu. Ayacuchensis</i>	Desconocido <i>Sciurus spp.</i> Desconocido
El Salvador	<i>L. infantum</i>	LV, LC	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi*</i>	Perro

Estados Unidos de América	<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lu. anthophora</i> <i>Lu. diabolica</i>	<i>Neotoma</i> spp.
	<i>L. infantum</i>	Desconocido	Desconocido	Perro
Guatemala	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi**</i>	Perro
	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. ylephiletor</i>	<i>Rattus rattus</i>
	<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	Desconocido
Honduras	<i>L. infantum</i> <i>L. panamensis</i>	LV, LC LC, LM	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i>	Perro Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. ylephiletor</i>	Desconocido
México	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. cruciata</i>	Desconocido
	<i>L. mexicana</i>	LC, LM, LCD	<i>Lu. olmeca olmeca</i> <i>Lu. cruciata</i> , <i>Lu. shannoni</i>	<i>Heteromys</i> spp. <i>Nyctomys</i> spp. <i>Otodylomys</i> spp. <i>Sigmodon</i> spp. <i>Peromyscus</i> spp.
	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. Evansi</i>	Perro
Nicaragua	<i>L. infantum</i>	LV, LC	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	Perro
	<i>L. panamensis</i>	LC	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. cruciata</i> <i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. panamensis</i>	Desconocido

Panamá	<i>L. panamensis</i>	LC, LM	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i> <i>Lu. sanguinaria</i> <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i>	<i>Choloepus hoffmanni</i>
	<i>L. braziliensis</i>	LC	<i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
	<i>L. colombiensis</i>	LC	<i>Desconocido</i>	<i>Choloepus hoffmanni</i>
Paraguay	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. intermedia</i>	Desconocido
	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. Longipalpis</i>	Perro
Perú	<i>L. peruviana</i>	LC, LM	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i> <i>Lu. ayacuchensis</i>	Perro <i>Didelphis albiventris</i> <i>Phyllotis andinum</i> <i>Akodon spp.</i>
	<i>L. lainsoni</i>	LC	<i>Lu. ubiquitalis</i>	Desconocido
	<i>L. amazonensis</i>	LC	Desconocido	Desconocido
	<i>L. guyanensis</i>	LC, LM	Desconocido	Desconocido
	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM, LCD	<i>Lu. tejadai</i> <i>Lu. Pescei</i>	Desconocido

Venezuela	<i>L. braziliensis</i>	LC, LM	<i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. trinidadensis</i> <i>Lu. spinicrassa</i> <i>Lu. panamensis</i>	Desconocido
	<i>L.colombiensis</i>	LC	<i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i>	Desconocido
	<i>L.venezuelensis</i>	LC, LCD	<i>Lu. olmeca bicolor</i>	Desconocido
	<i>L.amazonensis</i>	LC, LCD	<i>Lu. fl aviscutellata</i> <i>Lu. reducta</i>	Desconocido
	<i>L. pifanoi</i>			
	<i>L. garnhami</i>	LCD	<i>Lu. fl aviscutellata</i>	Desconocido
	<i>L. infantum</i>	LC LV	<i>Lu. youngi</i> <i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i> <i>Lu.pseudolongipalpis</i>	Desconocido Perro
	<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Desconocido</i>	Desconocido
	Uruguay	<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i>

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Área de estudio

El presente estudio se realizó en cuatro zonas geográficas distintas dentro de la zona de influencia de la Biósfera de la Reserva Montes Azules (REBIMA), en el estado de Chiapas, México. Características de la zona como: clima, altitud, flora, fauna silvestre y precipitación anual, fueron determinantes por ser un nicho ecológico idóneo para que subsista tanto el vector como el parásito.

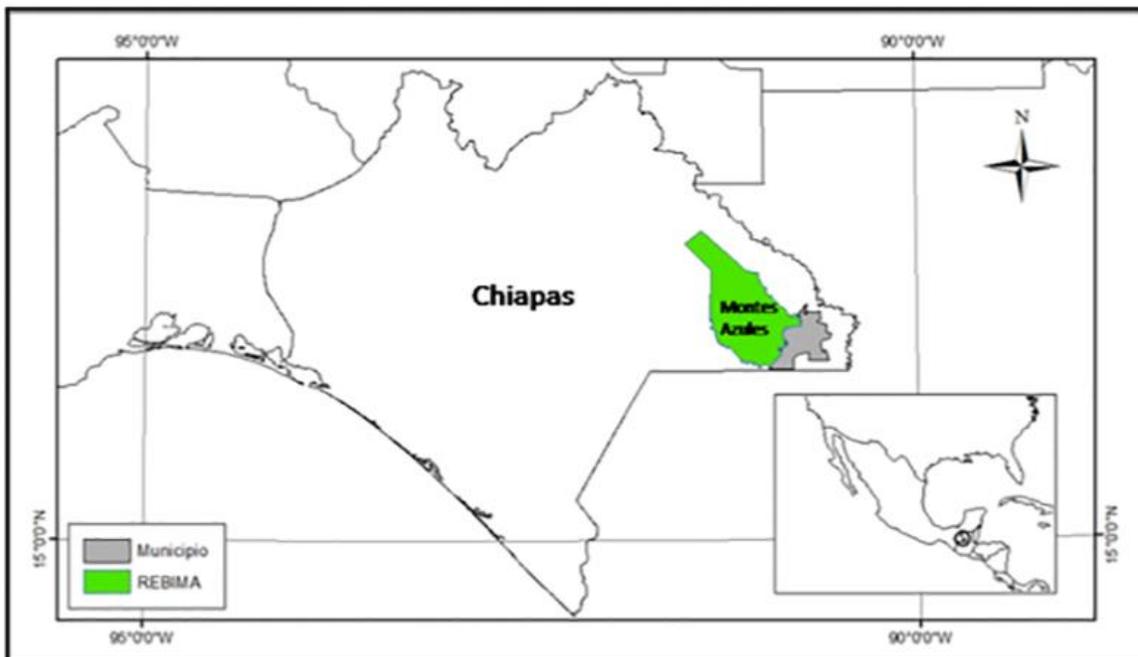


Figura 10. Ubicación de la Reserva de la Biosfera “Montes Azules” (REBIMA), en el Estado de Chiapas, México.

El estado de Chiapas, México, tiene las condiciones necesarias para que pueda coexistir el vector y los mamíferos susceptibles a infectarse (Becker, I., *et al.* 2005; Sánchez, G., *et al.* 2001), al inicio del estudio se advirtió de la presencia abundante de caninos domésticos tanto en las zonas urbanas como en las zonas rurales del área de estudio, lo que pudiera constituir un riesgo potencial de que estos animales estuvieran participando como reservorios de la enfermedad.

Gracias a datos suministrados de la jurisdicción sanitaria No. IX quienes indicaron una serie de municipios y localidades donde han existido casos de Leishmaniosis en humanos, es que

se orientó la elección de localidades incluidas en el presente estudio (Comunicación personal del Dr. Gabriel López Shirma, Coordinador de Salud Pública de la Jurisdicción Sanitaria No IX): San Quintín, Ocosingo, San Sebastián, Barrio Nuevo, Santo Domingo, Barrio Maya y Bonampak.

Cuadro 2. Datos poblacionales, socioeconómicos y geográficos de las localidades muestreadas. *Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL).

Localidad	Población*	Grado de Marginación*	Ámbito*	Latitud	Longitud
San Quintín	1,732	Alto	Rural	16.405556	-91.345833
Ocosingo	198,877	Muy Alto	Rural	25.8905	-102.5405
San Sebastián	144	Muy Alto	Rural	17.408889	-92.997222
Barrio Nuevo	2.170	Muy Alto	Rural	16.9067	- 92.0939
Santo Domingo	1,584	Muy Alto	Rural	17.026667	-91.417222
Barrio Maya	1,143	Muy Alto	Rural	16.9067	-92.0939
Bonampak	36	Muy Alto	Rural	25.8905	-102.5405

Por otro lado, se realizó la captura de vectores para posteriormente identificarlos y clasificarlos, los muestreos de dípteros fueron realizado en los mismos sitios donde se muestrearon a las macotas, las capturas se realizaron por la noche en un horario 20:00 a 24:00 hrs.

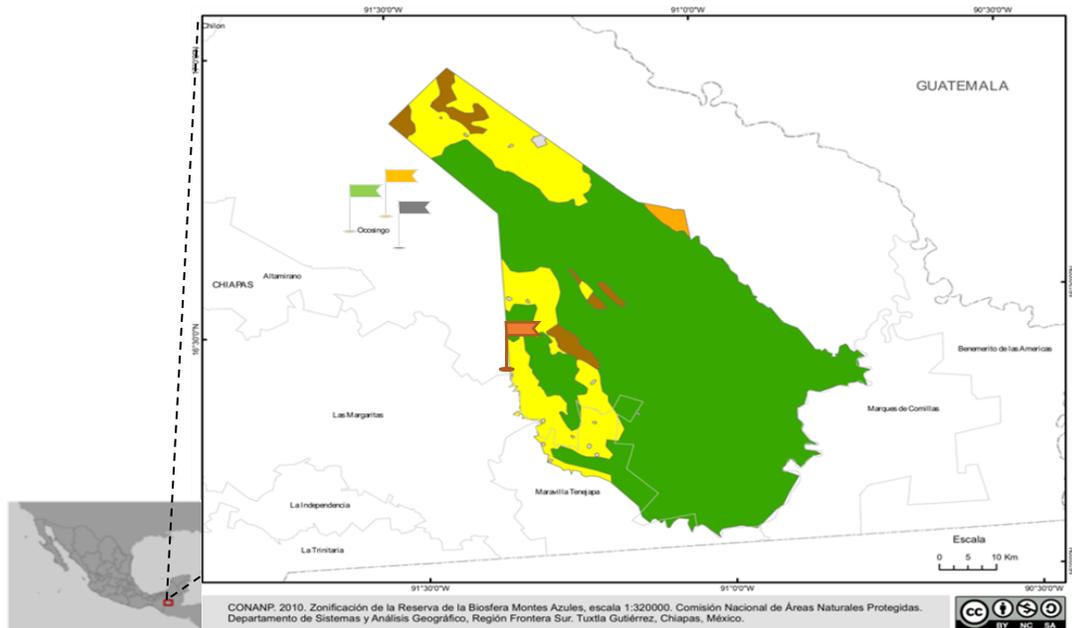


Figura 11. Distribución de las localidades dentro de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biosfera “Montes Azules” (REBIMA).

8.2. Permisos

Se tramitaron los permisos pertinentes para la “Colecta Científica” ante la SEMARNAT, este permiso se refiere a autorizaciones de actividades que consisten en la captura, remoción o extracción temporal o definitiva de material biológico del medio silvestre (ejemplares, partes y derivados), con propósitos no comerciales, para la obtención de información científica básica, integración de inventarios, incremento de acervos de las colecciones científicas o con propósitos de enseñanza (SEMARNAT, 2020), donde la Subsecretaria de gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre, Oficio No. **SGPA/DGVS/8054/19** autorizó dicha colecta científica, el cual se asignó a la bitácora **09/K6-0550/07/19**.

En representación de la CONANP en el sitio, el encargado de despacho de la Reserva de la Biósfera Montes Azules, el M.C. Sergio Montes Quintero autorizó el trámite CNANP-00-007 a través del oficio con numero **REBIMA/320/2019**, “Aviso de investigación con manipulación de flora y fauna”, haciendo cumplir con los artículos 85 y 87, todo con fundamento en los artículos 72 fracción II y 80 del reglamento Interior de la secretaria de medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

8.3. Obtención de muestras

Las muestras sanguíneas son un instrumento complementario, en el diagnóstico clínico en la detección de enfermedades, especialmente en especies de compañía, como lo es el canino (*Canis familiaris*). La confiabilidad de los resultados puede ser multifactorial, entre otros factores, desde la preservación de la integridad de la sangre, hasta la estabilidad de los elementos de la sangre, esto requiere de condiciones controladas en el manejo que incluyen desde la toma de la muestra hasta la realización de los análisis (Rosato, *et al.*, 2009).

Para la colecta se tomaron las muestras de sangre de la vena cefálica, utilizando el sistema al vacío (Vacutainer®) y tubos al vacío y con EDTA concentración 1mg/dl, como anticoagulante. Posteriormente, las muestras se trasladaron al Laboratorio de Parasitología de la FMVZ, para su procesamiento. La cantidad de sangre extraída fue de aproximadamente 5ml por ejemplar, de acuerdo con la concentración del anticoagulante.

El tiempo transcurrido, entre la extracción de la sangre y el arribo al laboratorio, no sobrepasó los 8 días. Durante este lapso, las muestras permanecieron en posición vertical y a una temperatura no mayor de 5° C. En el laboratorio, las muestras fueron colocadas en un refrigerador a una temperatura constante de 4°C.

Una vez dentro del laboratorio de Genética se procedió a realizar la extracción del ADN a cada muestra de sangre con un kit comercial (One-4-All Genomic ADN Miniprep Kit. Bio Basic®) a cada muestra de sangre y posteriormente se procesaron por la técnica de PCR punto final, para poder determinar la presencia de ADN de *Leishmania* spp. utilizando un protocolo de amplificación elaborado por Rodgers, M. *et al.*, 1990 y Reale, S. *et al.*, 1999.

Cada muestra que se tomó se realizó con previo consentimiento del dueño por escrito y firmando la carta responsiva. En ningún momento se utilizó algún medicamento, sedante o tranquilizante en el manejo de la mascota, durante el proceso de la toma de muestras sanguíneas, esto para reducir al máximo el sesgo que pudiera ocasionar en la muestra sanguínea. Solo se utilizó elementos de contención físicos como bozales por precaución de los médicos voluntarios, sujeción firme del ejemplar para inhabilitar o reducir el movimiento al mínimo, durante la toma de muestras sanguíneas, evitando todo tipo de maltrato al ejemplar, todo el manejo del ejemplar se realizó siempre con el dueño presente, obteniendo la muestra de sangre se liberaba el canino (*Canis familiaris*).

Los caninos (*Canis familiaris*) incluidos en el presente trabajo fueron seleccionados mediante un muestreo por conveniencia, estos animales según lo referido no estuvieron sujetos a programas de vacunación ni desparasitación, en su totalidad fueron animales criollos.

A todos los animales incluidos, se les practicó un examen clínico, registrándose en él los siguientes datos:

- Raza
- Edad
- Sexo
- Tamaño
- Complejión corporal
- Lesiones cutáneas
- Lesión mucocutánea
- Actividad de su mascota
- Historial veterinario (en caso de que existiera)

En el primero de los casos las lesiones cutáneas se dividieron en dos tipos, lesiones cutáneas alopecicas (LCA) y lesiones cutáneas ulcerativas (LCU). Como LCA se incluyeron los caninos que presentaron una disminución en la cantidad y calidad de pelo en el cuerpo, mientras que se consideraron como LCU, aquellas lesiones donde fue evidente la pérdida de tejido cutáneo.

8.4. Selección de la muestra

El grupo de estudio, estuvo conformado por caninos (*Canis familiaris*), con dueños y un hogar de residencia, considerando como parámetros de exclusión aquellos menores de dos meses, perras en lactación y perras en estado de gestación. Las perras gestantes no fueron incluidas para evitar generar estrés que podría ser perjudicial a su estado fisiológico.

El tamaño de la muestra requerida que se calculó fue de 150 caninos (*Canis familiaris*), considerando una prevalencia estimada del 11%.

El tamaño de la muestra fue obtenido usando el programa WinEpi, versión 4.

Se formulo en base a la cantidad de habitantes del estado de Chiapas (HC) que fue de 5.217.908 (INEGI), la población estimada de caninos (PC) en la República Mexicana 19.500.000 (FORBES) y por último se tomó el dato de la población total (PT) en México de 129.200.000 (INEGI) donde se utilizaron las siguientes formulas:

$$- PT / PC = CPH$$

$$129.200.00 / 19.500.000 = 6.62 \text{ caninos por habitante (CPH)}$$

$$- (CPH) (HC) = (TCC)$$

$$(6.62) (5217908) = 34.542.550 \text{ total de caninos en el Estado de Chiapas}$$

Asumiendo distribución normal (simétrica)

En una población de 34.542.550 individuos, y utilizando el cálculo basado en una distribución normal, se debe seleccionar una muestra con al menos 150 individuos para calcular una proporción estimada de 11% con un error aceptado (o precisión) de 5% y un nivel de confianza del 95%.

8.5.Encuesta

Se aplicó una encuesta a los propietarios, donde accedieron a que sus animales participaran en el estudio. Dicha encuesta estuvo conformada de 16 preguntas, que tenían como objetivo obtener información de los siguientes rubros: ubicación del ejemplar, características de la población, prevención de enfermedades en el ejemplar y en el núcleo familiar, conocimientos de la enfermedad de Leishmaniosis, observaciones clínicas y patológicas de los ejemplares muestreados (**Anexo A**).

8.6.Extracción de ADN

De las muestras sanguíneas obtenidas se utilizó un tubo al vacío con EDTA estéril, ya que este reduce la degradación del ADN, a todas las muestras obtenidas se les realizó extracción de ADN, usando el protocolo de extracción que viene dentro del kit de ADN one-4-all Genomic ADN Miniprep kit. (Bio Basic®).

8.6.1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

One-4-All Genomic ADN Miniprep Kit. Bio Basic®

Cuadro 3. Aplicaciones en las que se utilizó este kit comercial (Bio Basic®)

Muestra	Proporción	Resultado (ng)
Tejido animal	25 mg	5 – 15
Células	1 – 3 X 10 ⁷	15 – 25
Sangre	50 – 100 µl	1 - 3
Bacterias	1 ml	7 - 15

8.6.2. Datos de consideración previo a la extracción de ADN.

Este protocolo está diseñado para purificar el total de ADN presente en las muestras sanguíneas. todos los pasos de **centrifugación se realizaron a temperatura ambiente (15° C a 25°C)** en una microcentrífuga.

Se compruebo que el buffer ACL y el buffer CL no tuviera precipitaciones de sal antes de cada uso, si es necesario, para disolver el precipitado se elevó la temperatura de la solución a 56°C antes de utilizar. El buffer CE es 10 mM TRIS-HCL. EDTA de 0.5 mM, se puede usar agua alcalina con un pH de 9.0 como elución.

La solución CW1 y la solución CW2 se suministran como concentrados. antes de usar por primera vez, se agregó **17ml / 34ml / 85ml** ETANOL a **13ml / 26ml / 65ml** solución CW1; **21ml / 42 / ml / 105ml** ETANOL a **9 ml / 18 ml / 45 ml** solución CW2, respectivamente.

■ Procedure

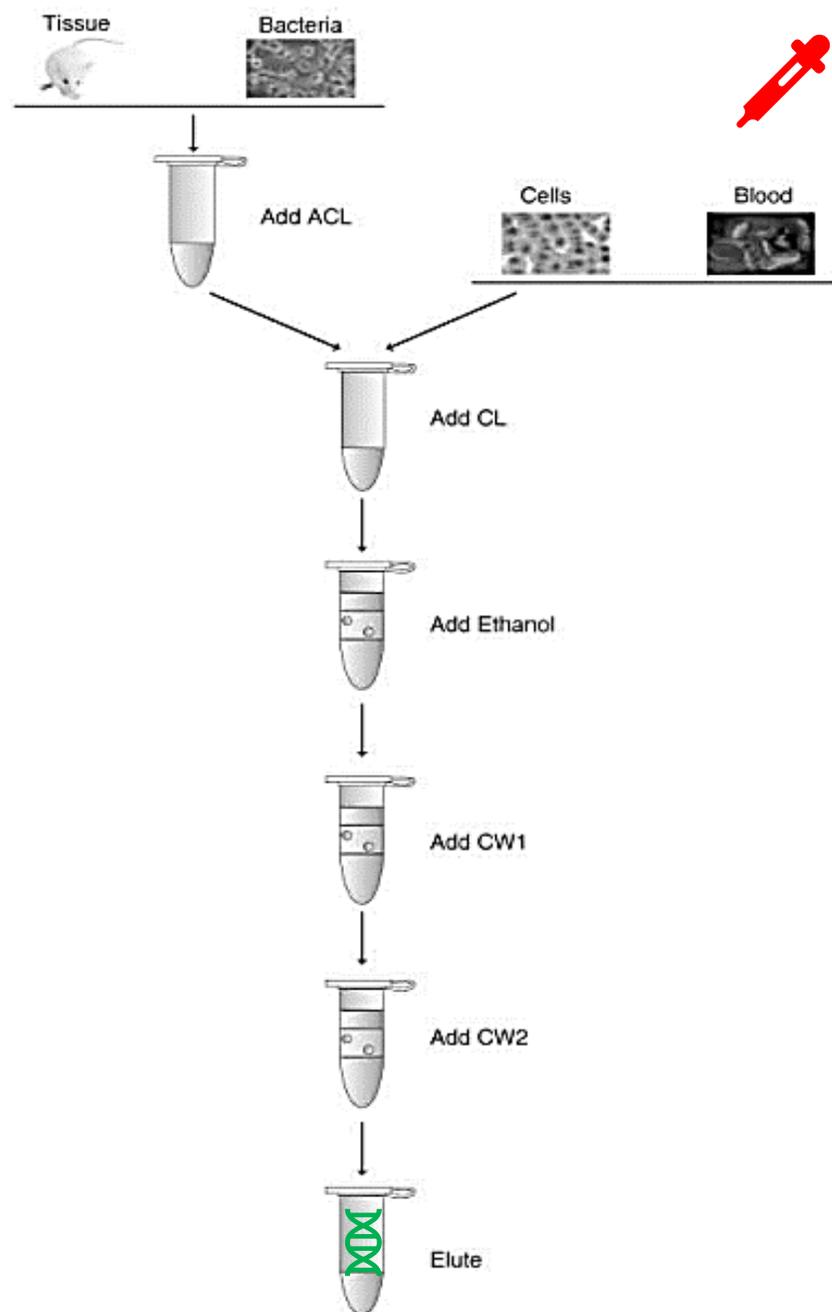


Figura 12. Flujoograma detallado del proceso de extracción a cada muestra sanguínea.

8.6.3. Preparación del extracto de ADN. -Colección y almacenamiento de muestras.

Una vez obtenidas las extracciones, estas muestras se congelaron inmediatamente y almacenaron a -20 °C. evitando la congelación y descongelación en repetidas veces, ya que esto conduce a la degradación del ADN.

Se recolecto la sangre en anticoagulantes como EDTA para evitar que la sangre se coagule. Sin embargo, la heparina no se recomienda, ya que puede unirse al ADN durante la purificación e inhibir la amplificación por PCR.

Después de la digestión de la proteínasa K, las muestras de tejido también se pueden almacenar en el tampón ACL durante 6 meses a temperatura ambiente sin ninguna reducción en la calidad del ADN.

8.6.4. Cantidades de muestras

El rendimiento y la calidad del ADN genómico dependen de la cantidad de material de partida. Es importante no excederse en la capacidad del tampón de lisis y la membrana. Se uso la cantidad aconsejable de material de partida de la siguiente manera:

Cuadro 4. Cantidad de muestra sanguina a utilizar, para la correcta extracción de ADN

(Bio Basic®)

Muestra	Cantidad
Tejido Muscular	30 mg
Hígado o cerebro	20 mg
Riñón o bazo	10 mg
Sangre de mamífero	100 µl
Sangre de ave o pez	10 µl
Cola de ratón	1.2 cm
Cola de rata	0.6 cm
Celulas cultivadas	5 X10 ⁶
Bacterias	2 X 10 ⁹

8.6.5. Protocolo utilizado (para sangre anticoagulada fresca o congelada)

- Se preparo la solución de PBS: cloruro de sodio 150 mM, fosfato de potasio 50 mM, pH = 7.2.

-Cosas que se hicieron antes de comenzar

- El Buffer CL, se calentó a 56°C para disolver antes de usar.
- La solución CW1 y la solución CW2 fueron diluidas.
- Se precalentó el baño maría y el agitador magnético a 56°C.

8.6.6. Procedimientos

1.- Se preparo la muestra (sangre)

1a. Se tomaron 20 µL de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml o 2 ml. Se añadió 100 µL sangre anticoagulada. Se ajustó el volumen a 220 µL con solución de PBS, se continuó con el paso 2.

- ✓ La muestra no se utilizó inmediatamente para la extracción de ADN genómico, se almacenó a -80 °C.
- ✓ Se evitó la congelación y descongelación repetidas de las muestras almacenadas, ya que esto pudo conducir a la degradación del ADN.

2.- Se agregó 200 µL de Buffer de CL a la muestra y se mezcló bien mediante agitación vorticial. Posteriormente se incubó a 56°C durante 10 min.

- ✓ Se usó el vórtice ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra.

3.- Se agregó 200 µL de etanol (96-100%) y se mezcló nuevamente.

4.- Se transfirió la mezcla del paso 3 (incluyendo cualquier precipitado) a la columna de centrifugado EZ-10 colocada en un tubo de colección de 2 ml. Y se centrifugó a 12,000 RPM por 1 min. Se desechó el flujo continuo.

5.- Se añadió 500 µL de solución CW1 y se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 RPM. Desechándose el flujo continuo.

6.- Se añadió 500 µL de solución CW2 y se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 RPM. Desechando el flujo continuo.

7.-Se coloco la columna vacía en el tubo de recolección y se centrifugo durante 2 minutos a 12,000 RPM, para secar la membrana. Desechando el flujo y transfiriendo la columna de centrifugado a un tubo de centrífuga limpio de 1.5 ml. Se incubo la columna de centrifugado abierta a temperatura ambiente durante 2-3 minutos hasta que el etanol se haya evaporado por completo.

- ✓ Se seco la membrana de la columna de rotación EZ-10, ya que el etanol residual puede interferir con las reacciones posteriores.

8.- Se añadió 50 - 100 µL de Buffer CE directamente a la parte central de la membrana. incubar a temperatura ambiente durante 2 min, y luego se centrifugo durante 2 min a 12,000 RPM para eluir el ADN.

- ✓ Se calentó el Buffer CE a 60 ° C aumentando la eficiencia de elución.
- ✓ Para una concentración máxima de ADN, se usó el eluato en el tubo de microcentrífuga para un segundo paso de elución.

El concentrado obtenido por cada muestra fue transferido, en esterilidad, a tubos ependorf de 1.5 ml y almacenadas a -20°C hasta la realización de PCR punto final.

8.7. Cebadores

El blanco para el cual fueron seleccionados los cebadores empleados en el presente trabajo fue el ADN del del kinetoplasto (ADNk), material genético que se almacena en la mitocondria del parásito (kinetoplasto), que es una región conservada (Pilatti, M. *et al.*, 2009). Los oligonucleótidos fueron adquiridos de la compañía Bio Basic Canadá Inc.

8.8. Elección del blanco de amplificadores

La detección molecular del patógeno considerado en el presente estudio, se realizó basandose en los protocolos publicacados por Rodgers, M. *et al.*, 1990 y Reale, S. *et al.*, 1999. Los oligonucleótidos que se utilizaron en el presente estudio fueron:

- Oligonucleotido 13a (de 18 pb, 5´a 3´) GTG GGG GAG GGG CGT TCT
- Ogilonucleotido 13b (de 21 pb, 3´a 5´) ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT

8.9. Amplificación de ADN de *Leishmania* spp.

La secuencia amplificada por los cebadores usados de un producto de 116pb y esta se encuentra registrada en la base de datos frl GeneBank con la clave AJ131633 por Reale et al., 1998.

El programa de amplificación que se utilizó para el presente estudio fue de una desnaturalización inicial a 95°C durante dos minutos, seguida de 28 ciclos, de alternancias de temperatura, un período de desnaturalización a 94°C por un minuto, un período de hibridación de los oligonucleótidos al ADN a 64°C durante 1 minuto, un periodo de elongación a 72°C durante 1 minuto.

8.10. Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizo agarosa (grado analítico) a una concentración de 1.5%.

8.11. Control positivo

El control positivo que se utilizo fue ADN genómico de *Leishmania infatum*, fue proporcionado por el Dr. Vicente Larraga Rodríguez de Vera, del Laboratorio de Parasitología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), dentro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España.

8.12. Análisis estadístico

La prevalencia de los casos positivos para *Leishmania* spp. en caninos (*Canis familiaris*) se expresó en porcentaje.

El análisis de los datos consistió en un análisis con Métodos No Paramétricos: Ji-Cuadrada y Prueba de Suma de Rangos Wilcoxon (también conocida como Mann-Whitney). Las pruebas son apropiadas para muestras independientes, ya que en este estudio el número de muestras por zona fue diferente.

En el caso de la Ji-Cuadrada fue usada para determinar diferencia estadística ($P < 0.05$) en términos generales para la reserva de los casos positivos y negativos; y la prueba Wilcoxon para detectar la diferencia estadística ($P < 0.05$) entre pares de las zonas (A vs B, A vs C, A

vs D, B vs C, B vs D y C vs D). El software SPSS se usó para el análisis de las pruebas pertinentes.

9. RESULTADOS

9.1. Población canina

Las muestras obtenidas en las localidades se distribuyeron de la siguiente forma: 32 muestras pertenecientes a la localidad de San Sebastián (**Zona A**), 51 muestras a la localidad de Barrio Nuevo (**Zona B**), 44 muestras a las localidades de Santo Domingo, Barrio Maya y Bonampak (**Zona C**) y 23 muestras de la localidad de San Quintín (**Zona D**).

El 46.2% de los caninos con resultados positivos fueron hembras (*Canis familiaris*) y el 53,8% restante, machos. El 44.8% de la población canina (*Canis familiaris*) positiva estuvo conformada por perros criollos jóvenes con un rango de edad de 1 a 3, que cumplían la función de guardianes de las viviendas, por lo que eran mantenidos fuera de ellas durante la noche.

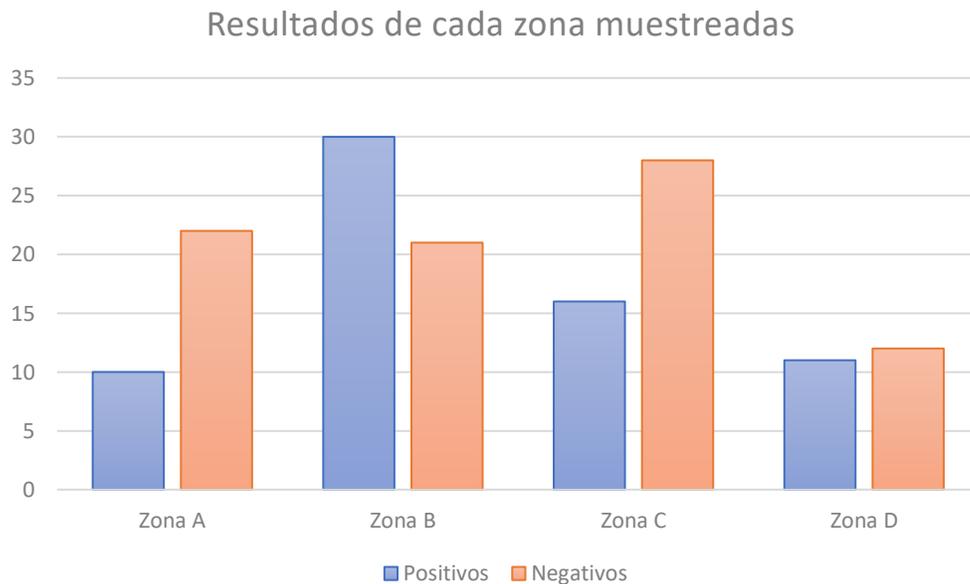


Figura 13. Distribución de los caninos (*Canis familiaris*) positivos para parásitos del género *Leishmania* spp. divididos por zonas.

9.2. Prevalencia de infección por *Leishmania* spp.

En la **Zona A** de estudio conformada por la localidad de San Sebastián, se tomó un total de 32 muestras de las cuales se obtuvieron 10 muestras positivas y 22 negativas dando un porcentaje de prevalencia del 31%.

En la **Zona B** de estudio conformada por la localidad de Barrio Nuevo, se tomó un total de 51 muestras de las cuales se obtuvieron 30 muestras positivas y 21 negativas dando un porcentaje de prevalencia del 59%.

En la **Zona C** de estudio conformada por las localidades de Santo Domingo, Barrio Maya y Bonampak, se tomaron un total de 44 muestras de las cuales se obtuvieron 16 muestras positivas y 28 negativas dando un porcentaje de prevalencia del 36%.

En la **Zona D** de estudio conformada por la localidad de San Quintín, se tomó un total de 23 muestras de las cuales se obtuvieron 11 muestras positivas y 12 negativas dando un porcentaje de prevalencia del 48%.

Cuadro 5. Distribución de prevalencia por cada zona de estudio.

Zona de estudio	Total, de muestras	Positivos	Negativos	% prevalencia
A	32	10	22	31%
B	51	30	21	59%
C	44	16	28	36%
D	12	11	12	48%

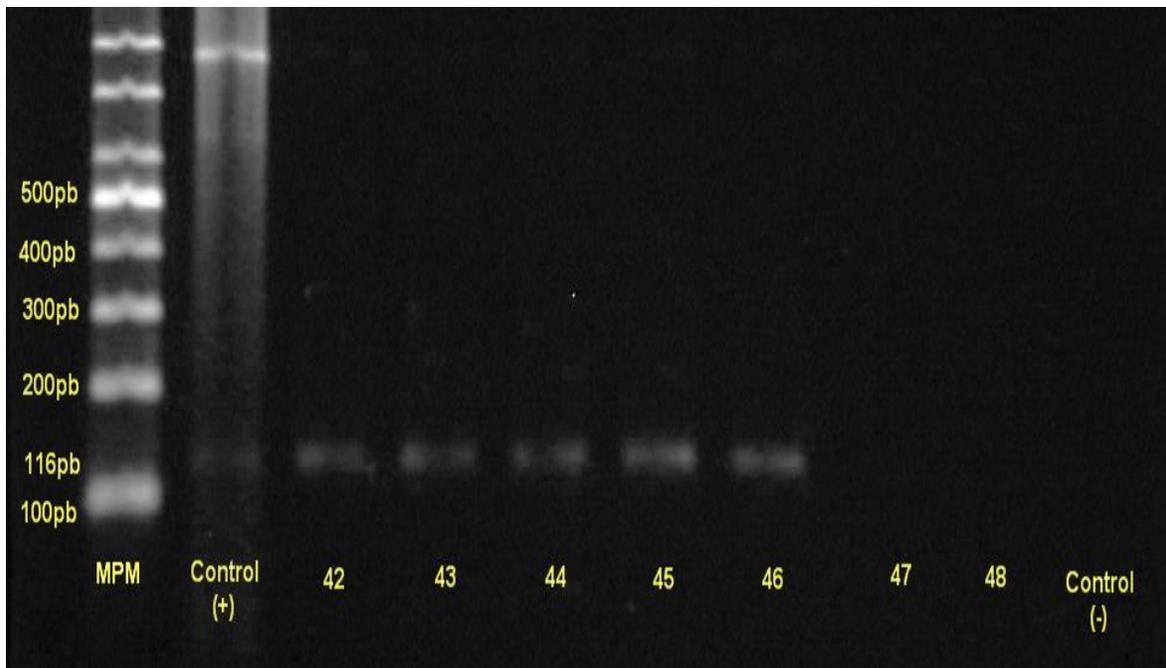


Figura 14. PCR punto final, en la imagen se observan 7 muestras en total, de las cuales solo 5 muestras amplificaron para *Leishmania* spp. y en las otras dos muestras se aprecian negativas a la presencia de ADN de *Leishmania* spp. MPM: marcador de peso molecular.

Analizando el total de las 150 muestras que se obtuvieron, 67 muestras resultaron positivas y un total de 83 muestras fueron negativas dando un 45 % y 55% respectivamente de prevalencia de muestras positivas y negativas a este parásito.

9.3.Relación de los resultados positivos con los signos clínicos de leishmaniosis, edad, sexo, talla y complexión física de los caninos (*Canis familiaris*).

El análisis de los datos de los signos clínicos indicativos de leishmaniosis canina respecto al resultado positivo para *Leishmania* spp., demostró que la presencia no está relacionada de forma directa con la infección por *Leishmania* spp.; de hecho, existe una mayor probabilidad de encontrar individuos positivos para *Leishmania* spp. siendo asintomáticos, esto lo pudimos constatar al ver en campo a los caninos y contrastando los resultados con las pruebas obtenidas en el laboratorio.

Signos clínicos característicos de leishmaniosis en caninos con resultados positivos en PCR

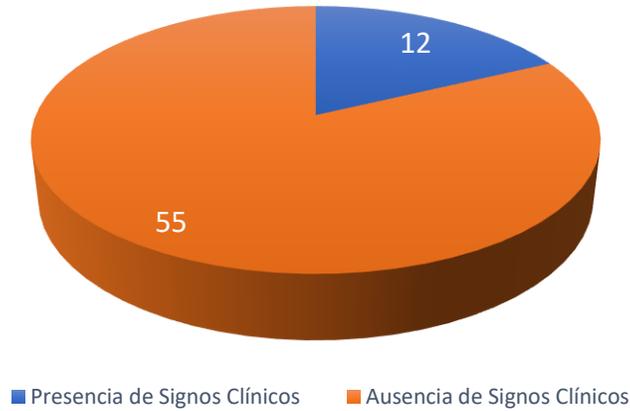


Figura 15. Caninos con signos clínicos característicos de Leishmaniosis y que resultaron resultado positivo al PCR.



Figura 16. Toma de muestra sanguínea a canino (*Canis familiaris*) sin la sintomatología aparente de Leishmaniosis canina.

Cuadro 6. Signos clínicos característicos de leishmaniosis que se presentaron en caninos muestreados.

Signos clínicos	Resultado (%)
Caquexia	20%
Onicogriposis	7%
Alopecia	90%
Lesiones cutáneas	40%

El 10 % (15/150) de los caninos (*Canis familiaris*) estudiados presentó, al menos, un signo clínico de leishmaniosis canina; los más prevalentes fueron caquexia 20% (3/15), onicogriposis 7 % (1/15), alopecia 90 % (13/15) y, en menor medida lesiones cutáneas 40 % (6/15). En el 80 % (12/15) de los caninos (*Canis familiaris*) sintomáticos se detectó ADN de *Leishmania* spp., (véase gráfico 3).



Figura 17. Canino (*Canis familiaris*) con la sintomatología aparente de Leishmaniosis canina, (presentó Caquexia, alopecias, lesiones cutáneas y onicogriposis) y al procesar la muestra por PCR, tuvo resultado positivo para *Leishmania* spp.

El 44,8 % de la población positiva estaba entre los 12 y los 36 meses de edad. Debido a que la mayor parte de la población canina pertenecía a ese intervalo de edad, se evaluó si existía diferencia entre este grupo compuesto de población juvenil y los grupos de mayor edad (intervalos de 1 a 12, 12 a 36, 36 a 60 y mayores de 108 meses); este análisis permitió hallar

una relación significativa entre los perros de 12 a 36 meses de edad y la infección por *Leishmania* spp. (**figura 18**).

Variación de las edades en los caninos

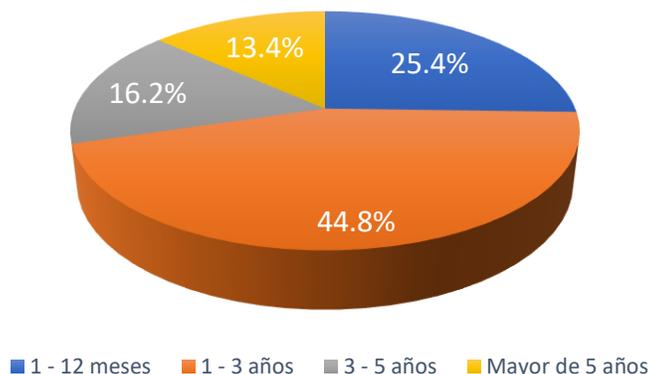


Figura 18. Variación de las edades de los caninos (*Canis familiaris*) positivos a *Leishmania* spp.

El 49,3 % de la población positiva en caninos (*Canis familiaris*) fue de talla de tamaño pequeña. Debido a que la mayor parte de la población canina pertenecía a ese intervalo de talla, se evaluó si existía diferencia entre este grupo compuesto de diferentes tallas de tamaño (intervalos de tallas: pequeña, mediana, grande y extra grande); este análisis permitió hallar una relación significativa entre los perros de talla pequeña y la infección por *Leishmania* spp. (**figura 19**).

Talla de caninos positivos

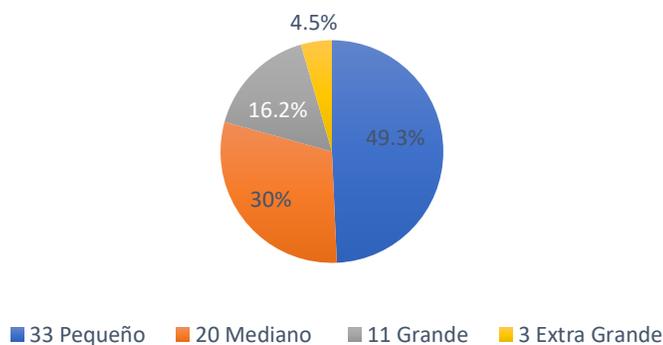


Figura 19. Variación de las tallas de tamaño de los caninos (*Canis familiaris*) positivos a *Leishmania* spp.

También se evaluó la complexión física de la población positiva en caninos (*Canis familiaris*) siendo la complexión normal la más encontrada con un 77.5%. Debido a que la mayor parte de la población canina pertenecía a ese intervalo de complexión, se evaluó si existía diferencia entre este grupo compuesto de diferentes complexiones físicas (intervalos de complexión: delgadez extrema, delgada, normal y obesidad); este análisis permitió hallar una relación significativa entre los perros complexión normal y la infección por *Leishmania* spp. (figura 20).

Complexión física de los caninos positivos

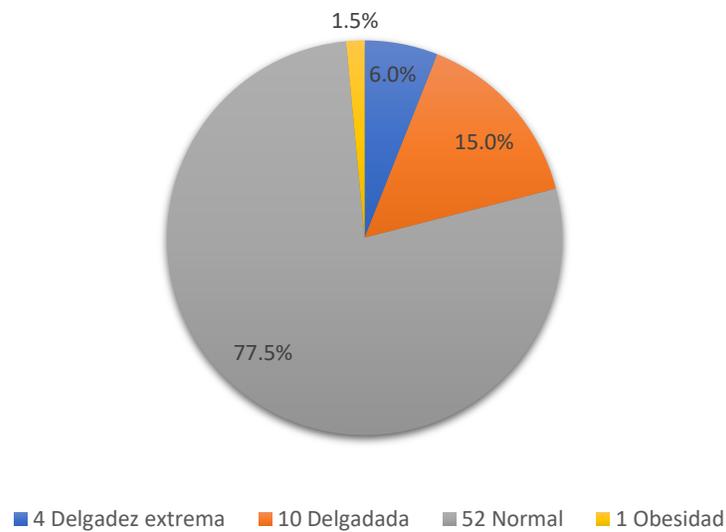


Figura 20. Variación de las complexiones físicas de los caninos (*Canis familiaris*) positivos a *Leishmania* spp.

El 53,8 % de la población positiva en caninos (*Canis familiaris*) fue de sexo masculino. Debido a que la mayor parte de la población canina pertenecía a ese intervalo sexo, se evaluó si existía diferencia entre estos dos grupos, este análisis permitió hallar una relación significativa entre los perros de sexo masculino y la infección por *Leishmania* spp. (figura 21).

Sexos en caninos positivos

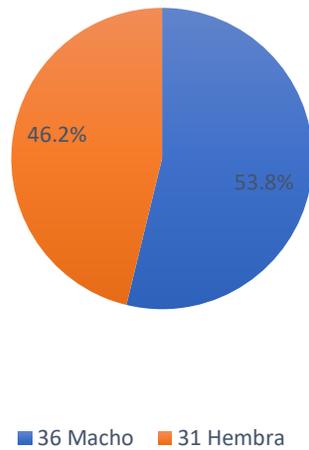


Figura 21. Variación de los sexos en los caninos (*Canis familiaris*) positivos a *Leishmania* spp.

9.4. Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizaron dos pruebas la primera fue la prueba de Chi-cuadrada que indico en términos generales, que existió una diferencia ($p < 0.05$) estadística entre las zonas de esta región en los casos positivos y negativos de las zonas A, B, C y D. Por lo cual se rechaza H_0 y se demuestra que existe diferencia estadística entre las zonas de esta región.

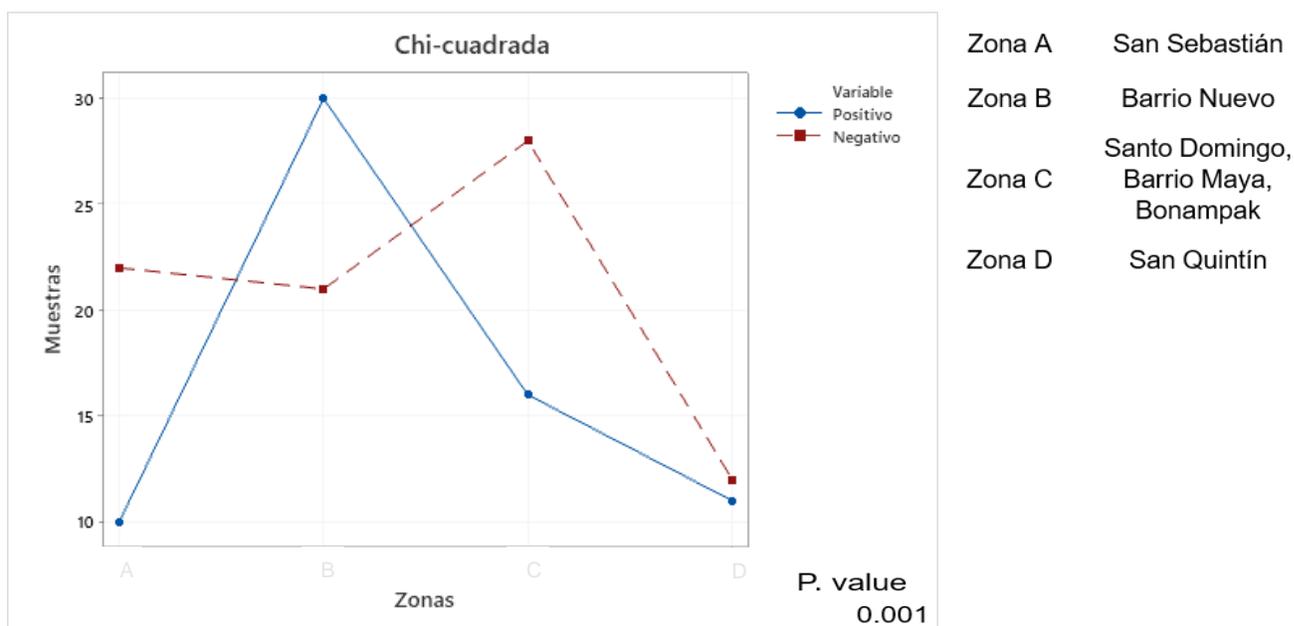


Figura 22. En esta grafica se muestra la diferencia significativa entre los casos positivos y negativos de las diferentes zonas muestreadas. (H_0 : Las muestras no difieren entre las zonas, H_a : Las muestras difieren entre las zonas).

Dentro del análisis estadístico del estudio presente, se utilizó la prueba de Mann-Whitney, donde esta prueba no paramétrica precisó ($p < 0.05$) dónde existieron más casos negativos (menos riesgo) y por ende la zona con un aumento en casos positivos; que en el presente trabajo fue la zona B y D, por lo tanto, el nivel de significancia de 0.05, indica que se rechaza la H_0 y se concluye que el número de muestras negativas y positivas tienen una diferencia estadística entre las zonas muestreadas.

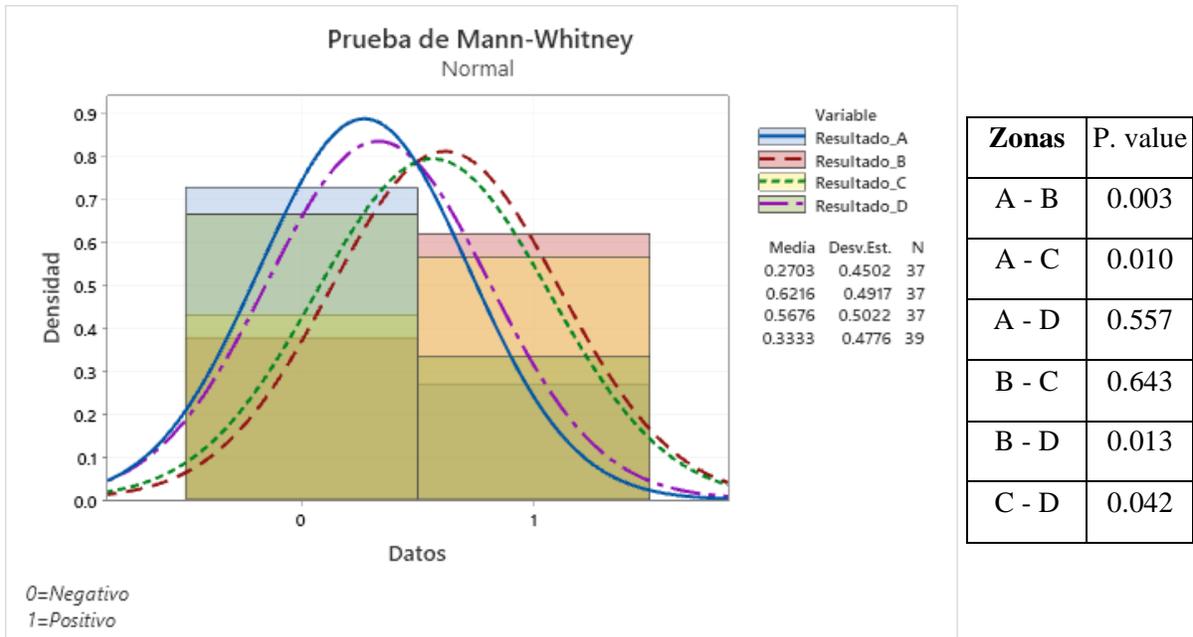


Figura 23. En esta grafica se muestra el nivel de significancia de 0.05, indica que se rechaza la H_0 y se concluye que el número de muestras negativas y positivas tienen una diferencia estadística entre las zonas. (H_0 : Las muestras no difieren entre las zonas, H_a : Las muestras difieren entre las zonas).

10. DISCUSIÓN

Las leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial con gran diversidad de parásitos, reservorios y vectores involucrados en la transmisión. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* spp. y se transmiten a los animales y humanos a través de la picadura de insectos de la subfamilia Phlebotominae (Leishmaniosis Sistema Regional de Informaciones de Leishmaniosis de la OPS/OMS, 2017).

La problemática en torno a esta enfermedad, radica entre otras cosas en la escasez de datos epidemiológicos y falta de medidas de control efectivas sobre los insectos vectores (Galati, E., et al. 2003).

La dispersión acelerada de las leishmaniosis hacia distintas regiones y escalas ecológicas (ecozonas, biomas y ecotopos) podría explicarse a través de la dinámica poblacional de los dos principales hospedantes, humanos (leishmaniosis humana [LHum]) y caninos (leishmaniosis canina [LCan]) (Ready, P. D., 2008).

Los resultados del presente estudio demuestran que, en la localidad de San Quintín, Chiapas existe una prevalencia positiva a *Leishmania* spp. del 48 % de la población canina analizada en este estudio. Esto se podría atribuir a que los caninos (*Canis familiaris*) residentes en estas zonas selváticas están más expuestos a contraer la leishmaniosis. Esto podría explicar el alto porcentaje de caninos (*Canis familiaris*) positivos, los cuales se encuentran permanentemente expuestos a la picadura del insecto vector, como dato adicional en este sitio se capturaron ejemplares de Phlebotominae con la trampa Shannon (resultados no publicados).

Varios caninos (*Canis familiaris*) positivos para *Leishmania* spp. presentaron uno o más signos clínicos de la enfermedad, el mayor porcentaje de estos fue asintomático. Existen trabajos en donde se ha demostrado la que una gran proporción de animales infectados permanecen asintomáticos, como lo observado en el presente trabajo donde el 82% de los animales fueron asintomáticos lo que concuerda con lo reportado por Ferrer en 1999 (Ferrer, L.1999).

Cabe señalar que el desenlace de la infección, así como la aparición de signos clínicos de la enfermedad está fuertemente influida por la respuesta inmune (Kramer, L., Calvi, L. E., & Grandi, G., 2006).

Un aspecto a considerar es que los signos clínicos de la Leishmaniosis canina (LC) en alguna etapa del curso de la enfermedad pueden ser similares a los de otras enfermedades (Ferrer, L. 1999; Oliveira, T. M., et al. 2008) por lo que el basarse solo en los signos clínicos no constituye una herramienta fiable en el diagnóstico.

A pesar de encontrar una baja presencia de signos clínicos característicos de la leishmaniosis en los animales evaluados, los resultados obtenidos, demostraron que no hay asociación entre la presencia y ausencia de las manifestaciones clínicas y la positividad a las pruebas diagnósticas (Romero, M., et al. 2008), esto pone de manifiesto que se estaría llevando al sacrificio a caninos no infectados, pero también que no se estaría detectando una proporción de animales infectados, que se convierten en fuentes de infección para la población canina y humana (Shadomy, S. V., et al. 2004). Todo esto, desde luego, interfiere en la evaluación del impacto de las medidas de control en Salud Pública que deberían mostrar una disminución en cifras ya sea de la incidencia o de la prevalencia de la leishmaniosis canina.

El incremento de las tasas de infección por *Leishmania* spp. en caninos (*Canis familiaris*) (Zona A 31%, Zona B 59%, Zona C 36% y Zona D 48%) de en las localidades muestreadas dentro de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biosfera Montes Azules, indiscutiblemente muestra un alza en las tasas de prevalencia de leishmaniosis canina (Becker, I., et al. 2005).

Por lo tanto, la población se encuentra en un riesgo latente ya que la urbanización y desarrollo agrícola conllevan cambios en el nicho del vector incrementando la exposición de caninos (*Canis familiaris*) y humanos con el mismo, esto ha empezado a originar la aparición de casos de LC en zonas periurbanas (Sánchez, L., et al. 2010) y LV en zonas urbanas (Pastor, J. A., et al. 2012). Hay que tener en cuenta que el mayor número de reportes de leishmaniosis humana provienen del sureste de la república (Javier, S. A. E., et al. 2014).

11. CONCLUSIÓN

Considerando los resultados de la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

1. Se demostró la presencia y la prevalencia de protozoos del género *Leishmania* spp. en caninos (*Canis familiaris*) con dueños, dentro de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biósfera Montes Azules.
2. Dentro de la Zona de Influencia de la Reserva de la Biosfera Montes Azules, particularmente en las localidades de San Sebastián, Barrio Nuevo, Santo Domingo, Barrio Maya, Bonampak y San Quintín existen poblaciones caninas que pueden actuar potencialmente como reservorio de la enfermedad de leishmaniosis.
3. La técnica de PCR, a partir de muestras sanguíneas permite detectar la presencia del parásito en poblaciones caninas, por lo que pudiera ser una herramienta útil para estudios epidemiológicos e identificar focos de transmisión activa que permitan establecer estrategias de control de la enfermedad.
4. Es poco viable establecer un diagnóstico definitivo, basándose únicamente en los signos clínicos característicos de la *Leishmaniosis canina*, ya que puede ser otro el agente causal como; *Ehrlichia canis*, *Tripanosoma cruzi* o alguna alteración inmunológica.

12. RECOMENDACIONES

1. Se debe de fomentar la supervisión y atención por parte de las autoridades competentes para poder controlar al vector y a sus reservorios, difundir información sobre esta enfermedad ocasionada por la *Leishmania* spp. ya que en la encuesta aplicada a los dueños de los caninos (*Canis familiaris*) más del 80% desconocía la enfermedad.
2. Las dependencias encargadas en la Salud Pública, de los tres niveles de gobierno deben vigilar los cambios epidemiológicos, debido a los cambios biológicos, climáticos y antropogénicos que varían y esto pone en riesgo a toda la población.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, A., Biagi, F., & Hernandez, A. N. (1963). Second autochthonous case of kala-azar in México. Visceral Leishmaniosis. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 20, 317-333.

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS neglected tropical diseases, 10(3), e0004349.

Albertos-Alpuche, N. (1990). Vectores de la Leishmaniosis cutánea en México. Rev Biomed, 1(2), 92-102.

Alexander, J., & Russell, D. G. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. In Advances in parasitology (Vol. 31, pp. 175-254). Academic Press.

Alfaro, M. L. C., & Echegoyen, R. G. (2010). Leishmaniosis y transfusión. Artículo de revisión. Revista Mexicana de Medicina Transfusional, 3(S1), 42-47.

Alvar, J. (2001). Las Leishmaniosis De la Biología al Control Laboratorios. Intervet SA, 200pp.

Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., ... & Moreno, J. (2008). The relationship between Leishmaniosis and AIDS: the second 10 years. Clinical microbiology reviews, 21(2), 334-359.

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... & WHO *Leishmaniasis* Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.

Andrade, A. S. R., & Melo, M. N. (2014). Non-invasive molecular diagnosis of canine visceral Leishmaniosis using conjunctival swab samples. Leishmaniosis —trends in epidemiology, diagnosis and treatment.

Andrade-Narvaez, F. J., Medina-Peralta, S., Vargas-Gonzalez, A., Canto-Lara, S. B., & Estrada-Parra, S. (2005). The histopathology of cutaneous Leishmaniosis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, México. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 47(4), 191-194.

Andrade-Narváez, F. J., Vargas-González, A., Canto-Lara, S. B., & Damián-Centeno, A. G. (2001). Clinical picture of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96(2), 163-167.

Arjona-Jiménez, G., Villegas, N., López-Céspedes, Á., Marín, C., Longoni, S. S., Bolio-González, M. E., ... & Sánchez-Moreno, M. (2012). Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(4), 252-258.

Ashford, R. W. (1996). Leishmaniosis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology*, 14(5), 523-532.

Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F. P., & Harris, E. (1999). Detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. *Journal of Parasitology*, 85, 181-187.

Báez Villasenor, J., Ruiloba, J., Rojas, E., Trevino, A., & Campillo, C. (1953). Un caso de kala-azar en México. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 34 (1), ene. 1953.

Bañuls, A. L., Hide, M., & Tibayrenc, M. (2002). Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S9-S13.

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097-1106.

Bates, P. A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 340-344.

Becker, I., Carrada-Figueroa, G., Gudiño-Zayas, M., González, C., Berzunza-Cruz, M., Rivas-Sánchez, B., & Velasco-Castrejón, O. (2005). Análisis de la Leishmaniasis en México. Consulta de expertos OPS/OMS sobre la Leishmaniosis visceral en las Américas, 23-25.

Bejarano, E. E., Uribe, S., Rojas, W., & Iván Darío, V. (2019). Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral Leishmaniosis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. *Artículo de revista*.

Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology*, 37(10), 1063-1075.

Biagi F, López R, Biagi BAM. "El kala-azar en México: Problema ecológico por estudiar". *Rev Inst Sal Enf Trop (Mex)* 1983; 25: 3-12

Boelaert, M., Criel, B., Leeuwenburg, J., Van Damme, W., Le Ray, D., & Van Der Stuyft, P. (2000). Visceral Leishmaniosis control: a public health perspective. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 465-471.

Bravo, L., Frank, L. A., & Brenneman, K. A. (1993). Canine leishmaniasis in the United States. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA).

Brun, R., BERENS, R. L., & KRASSNER, S. M. (1976). Inhibition of *Leishmania donovani* transformation by hamster spleen homogenates and active human lymphocytes. *Nature*, 262(5570), 689-691.

Cáceres, A. G., & Villaseca, P. Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión, Serie de Normas Técnicas No. 36. 2002. Instituto Nacional de Salud Lima, Perú.

Campbell, D. A., Thomas, S., & Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: ¿why be normal? *Microbes and infection*, 5(13), 1231-1240.

Campino, L., & Maia, C. (2018). The role of reservoirs: canine Leishmaniosis. In Drug resistance in *Leishmania* parasites (pp. 59-83). Springer, Cham.

Campino, L., Santos-Gomes, G., Capela, M. R., Cortes, S., & Abranches, P. (2000). Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 92(4), 269-275.

Castrejón, O. V., Rivas Sánchez, B., Saldaña, A. M., & Hobart, O. (2009). Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(4), 135-140.

Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R., & Russomando, G. (2013). Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 11(1).

Cruz-López, O., Tamariz-Cruz, O., Gándara-Ramírez, J. L., Rojas-Domínguez, R., & Cárdenas-Perea, M. E. (1997). A case of visceral Leishmaniosis. *Revista de investigación clínica; órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 49(3), 231-235.

Cupolillo, E., Grimaldi Jr, G., Momen, H., & Beverley, S. M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*, 73(1-2), 145-155.

Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2(1), 1-8.

DEDET, J. P., & Pratlong, F. (2000). *Leishmania*, *Trypanosoma* and *Monoxenous* Trypanosomatids as Emerging Opportunistic Agents 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1), 37-39.

Desachy, F. (2006). Las Zoonosis, transmisión de las enfermedades de los animales al ser humano. Barcelona: De Vecchi, S. A. U. p 161.

Desjeux, P. (1996). Leishmaniosis: public health aspects and control. *Clinics in dermatology*, 14(5), 417-423.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniosis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-318.

Dinesh, D. S., Ranjan, A., Palit, A., Kishore, K., & Kar, S. K. (2001). Seasonal and nocturnal landing/biting behaviour of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 95(2), 197-202.

Dorantes-Mesa, S. (1988). Cinco casos de kala-azar colectados en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México (Ed. española)*, 45(8), 546-551.

El Harith, Abdallah, Slappendel, R. J., Reiter, Ingrid., van Knapen, Frans., De Korte, P., Huigen, E., & Kolk, A. H. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *Journal of clinical microbiology*, 27(10), 2252-2257.

Eldridge, B. & Edman, J. (2000). *Medical Entomology : a Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods*. Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 236-261.

Endris, R. G., Young, D. G., & Perkins, P. V. (1987). Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 24(4), 412-415.

Enfermedades, C., 2015. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniosis. [online] gob.mx. Available at: <<http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf>

Evans, D. B., Godfrey, D., Lanham, S., Lanotte, G., Modabber, F., & Schnur, L. (1989). Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania* (No. Unpublished). World Health Organization.

Fausto, A. M., Maroli, M., & Mazzini, M. (1992). Ootaxonomy and eggshell ultrastructure of *Phlebotomus* sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 6(3), 201-208.

Fernandes, O., Murthy, V. K., Kurath, U., Degrave, W. M., & Campbell, D. A. (1994). Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Molecular and biochemical parasitology*, 66(2), 261-271.

Ferrer, L. (1999, January). Clinical aspects of canine leishmaniasis. In *International Canine Leishmaniasis Forum* (Vol. 1, pp. 6-10). Hoechst Roussel Vet.

Galati BAE, Cáceres GA, Le Pont F. Descrições de duas espécies novas de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) e considerações sobre o sub-gênero *Pifanomyia* (Ortiz & Scorza). Rev Bras Entomol 1995; 39 (2):431-46.

Galati, E. A. B. (2003). Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In Flebotomíneos no Brasil (pp. 53-175).

Gállego, M. (2004). Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las Leishmaniosis. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties, 23(2), 661-676.

Gallego, M., & Riera, C. (2000). Las leishmaniosis humanas: leishmaniosis autóctona por *Leishmania infantum*. Control de calidad SEIMC.

García, E. (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía. UNAM. México, D. F., 205 pp.

Haeckel, E. (1866). bd. Allgemeine anatomie der organismen (Vol. 1). G. Reimer.

Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. In Advances in parasitology (Vol. 44, pp. 1-39). Academic Press.

Handman, E., & Bullen, D. V. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends in parasitology, 18(8), 332-334.

Herwaldt, B., (1999). Leishmaniosis. Lancet 354, pp. 1191 – 1199.

Hoare, C. A., & Wallace, F. G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212(5068), 1385-1386.

Ibáñez-Bernal, Sergio, (1999). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) De Mexico. 1.- *Brumptomyia franca* Y Parrot *Lutzomyia franca*, Las Especies De *L. franca* Y Del Grupo Verrucarum. Folia Entomol. Mex, 107, 116.

Informativas, H., salud, L., & salud, L. (2020). OPS/OMS | Leishmaniosis en las Américas Hoja informativa para los trabajadores de salud. Retrieved 3 May 2019, from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13648:Leishmaniosis-fact-sheet-health-workers&Itemid=40721&lang=es

Javier, S. Á. E., Janett, C. L., & Renato, Z. C. I. (2014). Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México. Enfermedades infecciosas y microbiología, 34(1), 31.

Jawetz, E., Melnick J. & Adelberg E. (1979). Manual de Microbiología Médica. México: El Manual Moderno. p 578.

Kamhawi, S., Modi, G., Pimenta, P., Rowton, E., & Sacks, D. (2000). The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parásitology*, 121(1), 25-33. doi:10.1017/S0031182099006125

Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1974). *Leishmania* in phlebotomid sandflies I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 187(1089), 409-419.

Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H., Leaney, A. J. & Rioux. (1979) Aspects of the life-cycle of *Leishmania* in the sandfly. *Proceeding of the second european multicolloquy of parasitology*. Belgrado, Yugoslavia. Pp. 89-95.

Klaus, S. N. & Frankenburg, S.F. (1999) Leishmaniosis and other protozoan infections. En: Freedberg IM., Eizen AZ., Wolff K., et al. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, New York 1999:2609-2619

Kramer, L., Calvi, L. E., & Grandi, G. (2006). Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: Resistance and disease. *Veterinary research communications*, 30(1), 53-57.

Lainson, R., & Shaw, J. J. (1987). *Evolution, classification and geographical distribution*. Academic Press. pp.1-120.

Lainson, R., (1982). *Leishmaniosis* (1st ed., pp. 41-103). Boca Ratón, Florida: CRC Handbook series in Zoonoses.

Lainson, R., Ryan, L., & Shaw, J. J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(3), 421-424.

Lawyer, P. G., Young, D. G., Butler, J. F., & Akin, D. E. (1987). Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 24(3), 347-355.

Longoni, S. S., López-Céspedes, A., Sánchez-Moreno, M., Bolio-Gonzalez, M. E., Sauri-Arceo, C. H., Rodríguez-Vivas, R. I., & Marín, C. (2012). Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(5), 469-476.

López, J. (2012). Triada epidemiológica, método epidemiológico.

Loza Fernández de Bobadilla, E., Planes, A., & Rodríguez, M. (2003). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades*

Infeciosas y Microbiología Clínica. 3a Hemocultivos. Sociedad Española de Enfermedades Infeciosas en Microbiología Clínica.

Ivar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.

Maia, C., & Depaquit, J. (2016). ¿Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, 23.

Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J. M., Gonçalves, L., & Campino, L. (2009). Diagnosis of canine Leishmaniosis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179(1), 142-144.

Mamani, Z. A. (1998). Elaboración de una genoteca de expresión: aislamiento y caracterización de un gen codificante para la histona H1 de *Leishmania braziliensis* (Doctoral dissertation, Universidad de La Laguna). - Benne, R. (1994). RNA editing in trypanosomes. In *EJB Reviews 1994* (pp. 75-89). Springer, Berlin, Heidelberg.

Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Della Morte, R., ... & Gravino, A. E. (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 125(3-4), 251-262.

Margonari, C., Freitas, C. R., Ribeiro, R. C., Moura, A. C. M., Timbó, M., Gripp, A. H., ... & Dias, E. S. (2006). Epidemiology of visceral Leishmaniosis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1), 31-38.

Martínez, F. V., Torres Guerrero, E., Arenas, R., & Cedillo, M. Q. (2011). Leishmaniosis en México. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 39(4), 163-183.

Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *BioMed Research International*, 2010.

Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science*, 118(2), 283-290.

Missawa, N. A., & Maciel, G. B. M. L. (2007). List of species in the genus *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) from the State of Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1), 11-14.

Molina, R., (1991). Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Research and Reviews in Parasitology*. 51. 87-89.

Molyneux, D. H., & Killick-Kendrick, R. (1987). Morphology, ultrastructure and life cycles. *The Leishmaniasis in biology and medicine*, 1, 121-176.

Monroy-Ostria, A., Hernandez-Montes, O., & Barker, D. C. (2000). Aetiology of visceral Leishmaniosis in México. *Acta Tropica*, 75(2), 155-161.

Montalvo Vázquez AM. Leishmaniosis en pediatría. Reporte de cinco casos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tesis para la Especialidad en Pediatría Médica, UNAM,

Montor, J. M., Piedra, A. L., Terrazas, L. I., & Bello, R. H. (2016). Parasitosis más comunes en la población mexicana. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Moreno, S. T. (2000). Clonación y caracterización molecular del gen codificante de la ADN polimerasa beta nuclear del protozoo parásito *Leishmania infantum* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in Leishmaniosis. *The Lancet*, 366(9496), 1561-1577.

Muskus, C. E., & Villa, M. M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomedica*, 22(2), 167-77.

Nieves E. A., (2000) biología do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no flebotomíneo *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte-Brasil. 148 pp.

Nieves, E., & Rondon, M. (2007). Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 529-538.

Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W., & Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of clinical microbiology*, 36(10), 2877-2881.

Ocádiz, J. (1999). Epidemiología en animales domésticos; Control de Enfermedades. Universidad Autónoma de Chapingo: trillas. p 143.

Ochoa-Díaz, Y. O., Lopez-Moreno, C. Y., Rendon-Maldonado, J. G., & Lopez-Moreno, H. S. (2012). Molecular diagnosis of *Leishmania mexicana* in a cutaneous Leishmaniosis case in Sinaloa, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 78-80.

Okwor, I., & Uzonna, J. (2016). Social and economic burden of human Leishmaniosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(3), 489-493.

Oliveira, G. G. D. S., Santoro, F., & Sadigursky, M. (1993). The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(2), 243-248.

Oliveira, T. M. F., Furuta, P. I., Carvalho, D. D., & Machado, R. Z. (2008). Study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(1), 7-11.

OPAS, O. D. S. (2019). Manual de procedimientos para vigilancia y control de las Leishmaniosis en las Américas. OD Salomon, F. Edilson Ferreira Lima Jr RA e S, organizador. OPAS Organización Pan Americana de Saúde. Washington: OPAS.

OPS/OMS | Leishmaniasis en las Américas. Pan American Health Organization / World Health Organization, (2017). Recuperado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9470:Leishmaniasis-factsheet&Itemid=40721&lang=es

Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniosis Sistema Regional de Informaciones de Leishmaniosis de la OPS/OMS (SisLeish). Washington, D.C.: OPS; 2017

Pacheco, O. F. M. (2014). Búsqueda de atrayentes para *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) (Doctoral dissertation, El Colegio de la Frontera Sur)

Pan American Health Organization/World Health Organization – PAHO/WHO. (2017). Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniosis in the Americas 2017-2022 [Ebook] (1st ed., pp. 7 - 63). Retrieved from <https://www.paho.org/en/documents/plan-action-strengthen-surveillance-and-control-Leishmaniosis -americas-2017-2022>

Pastor-Santiago, J. A., Chávez-López, S., Guzmán-Bracho, C., Flisser, A., & Olivo-Díaz, A. (2012). American visceral Leishmaniasis in Chiapas, México. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(1), 108-114.

Paternina-Gómez, M., Díaz-Olmos, Y., Paternina, L. E., & Bejarano, E. E. (2013). Alta prevalencia de infección por *Leishmania* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) en caninos del norte de Colombia. *Biomédica*, 33(3), 375–382.

PECH-MAY, A., Escobedo-Ortegon, F. J., Berzunza-Cruz, M., & REBOLLAR-TÉLLEZ, E. A. (2010). Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in México. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(2), 150-161.

PEDROSO, A. M. (1913). Leishmaniose local do cão. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, 1(2), 33-39.

Pérez-Vega, J. H., López-Moreno, C. Y., López-Valenzuela, J. Á., Rendón-Maldonado, J. G., & López-Moreno, H. S. (2009). Leishmaniosis cutánea causada por *Leishmania*

mexicana en Durango, México. Informe del primer caso clínico. Gaceta médica de México, 145(5), 433-435.

Pilatti, M., de Almeida Ferreira, S., de Melo, M., & Silva Ribeiro de Andrade, A. (2009). Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral Leishmaniosis in conjunctival swab samples. *Research in Veterinary Science*, 255-257. doi:10.1016/j.rvsc.2009.02.005

Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Rowton, E., Modi, G. B., Garraway, L. A., Beverley, S. M., ... & Sacks, D. L. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 9155-9159.

Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009. São Paulo, Brazil

Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Quieroz JW, et al. Canine visceral Leishmaniosis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 2009;86:267-273.

Quintal, A. P. N., de Souza Ribeiro, É., Rodrigues, F. P., Rocha, F. S., Floeter-Winter, L. M., & Nunes, C. M. (2011). *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. *Veterinary parasitology*, 176(2-3), 112-119.

Ravel, S., Cuny, G., Reynes, J., & Veas, F. (1995). A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta tropica*, 59(3), 187-196.

Ready, P. D. (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech*, 27(2), 399-412.

Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N. S., Caracappa, S., & Vesco, G. (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2931-2935.

Reithinger, R., Teodoro, U., & Davies, C. R. (2001). Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerging infectious diseases*, 7(5), 872.

Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast ADN as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental parasitology*, 71(3), 267-275.

Rojas, M. (2004). *Nosoparásitos de los rumiantes domésticos peruanos* (2nd ed., p. 3). Lima, Perú

Romero, M., López, M., Echeverry, M., & Rivas, F. (2008). Leishmaniasis visceral canina: pruebas diagnósticas no identifican estados reales de la infección. *Revista de salud pública*, 10, 290-298.

Roncal, C. U. 2. Leishmaniosis humana. Un problema de salud, (2016).

Rosato, P. N. R., F. G. V Gama, M. A. Brunet., M. O. S. Gomes, and A. E. Santana. 2009. Effects of storage time and temperatura on biochemistry results from canine serum. Abstract Nr.

Row, R. (1912). *Leishmania donovani* And *Leishmania tropica*. *British medical journal*, 1(2674), 717.

Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual reviews in microbiology*, 55(1), 453-483.

Sadlova, J., & Volf, P. (1999). Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parásitology*, 118(5), 455-460.

Sánchez-García, L., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fausser, I., & Rebollar-Téllez, E. A. (2010). Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) *mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(6), 406-411.

Sanchez-Tejeda, G., Rodríguez, N., Parra, C. I., Hernández-Montes, O., C Barker, D., & Monroy-Ostria, A. (2001). Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayarit, State of Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(1), 15-19.

Santos-Gomes, G. M., Campino, L., & Abranches, P. (2000). Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2), 193-198.

Schantz, P., Steurer, F., Jackson, J., Rooney, J., Akey, B., Duprey, Z., ... & Gramiccia, M. (2001, May). Emergence of visceral Leishmaniosis in dogs in North America. In *Proc Int Canine Leishmaniosis Forum* (pp. 20-24).

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Dirección General de Vida Silvestre, junio, 2020.

Shadomy, S. V., Waring, S. C., & Chappell, C. L. (2004). Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(2), 313-319.

Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45(4), 255-72.

Shaw, J. J. (1988). Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 83, 486-490.

Simpson, L., & Thiemann, O. H. (1995). Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds. Cell, 81(6), 837-840.

Sinave/DGE/Salud (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología/Salud). Vigilancia epidemiológica. Boletín epidemiológico. 2015. p. 40–1.

Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of Leishmaniosis. Indian Journal of Medical Research, 123(3), 311.

Slappendel, R. J. (1988). Prize-winning paper Jubilee Competition: Canine leishmaniasis: A review based on 95 cases in the Netherlands. Veterinary Quarterly, 10(1), 1-16.

Sogin, M. L., Elwood, H. J., & Gunderson, J. H. (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small subunit rRNA genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83(5), 1383-1387.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A. Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., & Ferrer. (26 de 05 de 2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology (165),1-18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022

Souza, W. D. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current pharmaceutical design, 8(4), 269-285.

Stierhof, Y. D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., & Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. European journal of cell biology, 78(10), 675-689.

Thomson, J. G., & Sinton, J. A. (1921). *Leishmania donovani*, in cultures, recovered from spleen during life and from the bone marrow of the cadaver. Proc.R.Soc.Med. 14, pp. 21 – 23.

Tierney, L., McPHEE, S., & Papadakis, M. (1999). Diagnóstico Clínico y tratamiento, 41ª. México DF Manual Moderno.

Tolezano, J. E., Uliana, S. R., Taniguchi, H. H., Araújo, M. F., Barbosa, J. A., Barbosa, J. E., ... & Shaw, J. J. (2007). The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral Leishmaniosis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. Veterinary parasitology, 149(3-4), 280-284.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Ceillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017), 6, 750. DOI, 10.

Trejo-Perez, J. A., Miranda-Navales, M. G., Solorzano-Santos, F., Cabrera-Munoz, L., & Díaz-Ponce, H. (1993). Kala-azar in Mexico: report of 2 cases. *Boletín médico del Hospital Infantil de Mexico*, 50(9), 662-665.

Turco, S. J., Späth, G. F., & Beverley, S. M. (2001). Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in parasitology*, 17(5), 223-226.

Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B., Damián-Centeno, A. G., Itzá-Ortiz, M. F., & Andrade-Narváez, F. J. (2000). Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in naturally infected rodents from the state of Campeche, Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(5), 595-600.

Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B., Sosa-Bibiano, E. I., Rivero-Cárdenas, N. A., & Andrade-Narváez, F. J. (2009). Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in five foci of cutaneous Leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(2), 87-94.

Vasquez-Trujillo, A. (2006). Registro de leishmaniasis cutánea en caninos presentes en zonas peri-urbana de Villavicencio, Meta y su importancia en la salud pública. *Orinoquia*, 10(2), 79-86.

Velasco-Castrejón, O., Guzmán-Bracho, C., Rivas-Sánchez, B., Aguilar-Torrentera, F., & Hernández-Márquez, G. (1994). Las Leishmaniasis con especial referencia a México. *Publicación técnica del IndRE*, (4)

Walters, L. L., Irons, K. P., Chaplin, G., & Tesh, R. B. (1993). Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 30(4), 699-718.

Ward, R. D. (1985). Vector biology and control. *Leishmaniosis, Human Parasitic Diseases*, 1, 99-212.

Ward, R. D., & Ready, P. A. (1975). Chorionic sculpturing in some sandfly eggs (Diptera, Psychodidae) 1. *Journal of Entomology Series A, General Entomology*, 50(2), 127-134.

Werneck, G. L., Costa, C. H. N., Walker, A. M., David, J. R., Wand, M., & Maguire, J. H. (2007). Multilevel modelling of the incidence of visceral Leishmaniosis in Teresina, Brazil. *Epidemiology & Infection*, 135(2), 195-201.

Williams, P. (1993). Relationships of *Phlebotomine* sand flies (Diptera). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(2), 177-183.

Wilson, R. (2014). Bird and Wildlife photography. Recuperado el 23 de septiembre de 2016, de http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.htm l.

World Health Organization (WHO), (2017). Available from: [online] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>-

World Health Organization. (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010. WHO technical report series, (949).

World Health Organization. (2017). Pan American Health Organization. Leishmaniosis: Epidemiological Report of the Americas (No. 7-2019). Report.

Young, D. G. (1979). A review of the blood sucking psychodid flies of Colombia (Diptera, Phlebotominae and Sycoracinae). Revisión de las moscas psicódidias de Colombia (Diptera, Phlebotominae y Sycoracinae). Florida Agricultural Experiment Stations Bulletin., (806), 1-262.

Young, D., & Arias, J., (1992), Instituto nacional de salud manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad del Carrión. OPS; Cuaderno Técnico N°33.

Zimmerman, J. H., Newson, H. D., Hooper, G. R., & Christensen, H. A. (1977). A comparison of the egg surface structure of six anthropophilic phlebotomine sand flies (*Lutzomyia*) with the scanning electron microscope (Diptera: Psychodidae). Journal of medical entomology, 13(4-5), 574-579.

ANEXO A



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL
ENCUESTA TESIS DE *LEISHMANIA*



Ubicación:	Muestra No.:	Fecha:	
Nombre del dueño de la mascota:			
Algún tipo de contacto:			
1.- Tamaño de la mascota			
a) Pequeño	b) Mediano	c) Grande	d) EG
2.- ¿Qué edad tiene su mascota			
a) 1 - 12 meses	b) 1 - 3 años	c) 3 - 5 años	d) Mayor de 5 años
3.- ¿Sexo de la mascota?			
a) Hembra	b) Macho		
4.- Complejión corporal			
a) Delgadez extrema	b) Delgada	c) Normal	d) Obesidad
5.- ¿Presenta alguna lesión cutánea?			
a) Sí	b) No		
6.- ¿Presenta alguna lesión mucocutánea?			
a) Sí	b) No		
7.- ¿Su mascota sale fuera de su casa/terreno?			
a) Sí	b) No		
8.- ¿Su mascota tiene acceso al interior de su casa?			
a) Sí	b) No		
9.- ¿Alguna vez a vacunado o llevado a su mascota con un MVZ?			
a) Sí	b) No		
10.- ¿Su mascota está castrada/OVH?			
a) Sí	b) No		
11.- ¿Ud. Conoce la enfermedad "Leishmaniosis"?			
a) Sí	b) No		
12.- ¿Por qué medio se ha enterado o escuchado de esta enfermedad?			
a) Sector Salud/Tríptico	b) Televisión	c) Internet	d) Nunca la escuche
13.- ¿Ha conocido a alguien que se enfermara por leishmaniosis?			

a) Sí		b) No	
14.- ¿Según su perspectiva en que temporada del año hay mayor presencia de mosquitos (mosca chiclera, palomilla o papalotilla)?			
a) Ene. - Mar.	b) Abr. - Jun.	c) Jul. - Sep.	d) Oct. - Dic.
15.- ¿Utiliza algún repelente para Ud. o su casa?			
a) Sí		b) No	
16.- ¿ En caso que la respuesta sea afirmativa indique cuál?			

ANEXO B



Ejemplares de Phlebotominae, capturados en San Quintín, Chiapas.