

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS DEL
GÉNERO *LEISHMANIA* EN ANIMALES DE INTERÉS
PECUARIO EN TECUALILLA, ESCUINAPA, SINALOA,
MÉXICO**

**Tesis que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

BIÓL. DORA MARGARITA BORREGO URREA GALAVÍZ

DIRECTORES:

DR. VICENTE OLIMÓN ANDALÓN

DR. EDITH HILARIO TORRES MONTOYA

Culiacán Rosales, Sinaloa a julio de 2021.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es dedicado principalmente a mi hija Aurora, quien siempre me ha demostrado su amor y su paciencia. Hija, eres el motor y la motivación más grande en mi vida, quien me empuja a seguir preparándome día con día con el fin de ofrecerte todo lo que mereces. Es infinito el amor y el agradecimiento que por ti siento. Te amo con toda el alma.

Dedico también esta tesis a mis padres, Alberto Enrique Borrego Urrea y Blanca Lucía Galavíz Félix porque este logro también es suyo, sin el apoyo que siempre he recibido de ustedes mi andar no sería nada sencillo. Me siento muy afortunada al tenerlos conmigo, los amo inmensamente.

A mi hermana, María de Jesús Borrego Urrea Galaviz quien es mi compañera de vida, mi mejor amiga y mi peor enemiga. Gracias hermana por todos nuestros momentos, eres uno de mis grandes amores.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Biología y al programa de Maestría en Ciencias Biológicas por cobijarme y brindarme sus instalaciones durante este proceso.

A mis directores Dr. Vicente Olimón Andalón, quien de ser mi profesor en la Licenciatura en Biología se convirtió en mi amigo. Gracias por la confianza que en mí depositaste y por el apoyo incondicional brindando durante mi formación como Maestra en Ciencias; así también al Dr. Edith Hilario Torres Montoya por permitirme ser parte del equipo de trabajo al cual pertenece, por su respaldo y por su interminable paciencia en mi proceso de aprendizaje.

A mis asesores de tesis: Dra. Gabriela Silva Hidalgo y Dr. Hipólito Castillo Ureta, y a mi revisor M. en C. César Enrique Romero Higareda, por su comprensión y por brindarme su apoyo siempre que fue necesario.

Muy especialmente quiero agradecer al Dr. José Marcial Zazueta Moreno, por compartirme su conocimiento sobre el tema, por toda la ayuda brindada principalmente en la parte experimental de este proyecto; así como a la Biomédica Iliana Cota Gerardo quien también fue un gran apoyo para mí.

Al M. en C. José Israel Torres Avendaño por mostrarme siempre interés y disposición para aclarar mis inquietudes y a la Dra. Loranda Calderón Zamora quien me ha demostrado una amistad sincera y a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre tenía la disposición y el tiempo para atenderme

ÍNDICE

I.	INDICE DE CUADROS.....	iv
II.	INDICE DE FIGURAS.....	v
III.	INTRODUCCIÓN.....	1
IV.	MARCO TEÓRICO	4
4.1.	Enfermedades tropicales en el mundo.....	4
4.2.	Agente etiológico <i>Leishmania spp.</i>	5
4.2.1.	Manifestaciones clínicas de leishmaniasis.....	7
4.3.	Diagnóstico.....	12
4.3.1.	Diagnóstico parasitológico	13
4.3.2.	Cultivo	13
4.3.3.	Diagnóstico histológico	14
4.3.4.	Diagnóstico inmunológico.....	14
4.3.5.	Diagnóstico molecular	15
4.4.	Tratamiento	15
4.4.1.	Antimoniales.....	16
4.4.2.	Miltefosina	16
4.4.3.	Paramomicina.....	17
4.4.4.	Anfotericina B	18
4.4.5.	Imidazol	18
4.5.	Epidemiología.....	19

4.5.1.	Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	22
4.5.2.	Ciclo de vida.....	23
4.6.	Vectores.....	24
4.7.	Reservorios silvestres.....	27
4.8.	Reservorios domésticos.....	28
4.9.	Reservorios de interés pecuario.....	29
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	32
VII.	HIPÓTESIS.....	33
VIII.	OBJETIVOS.....	34
8.1.	Objetivo general.....	34
8.2.	Objetivos específicos.....	34
8.2.1.	Detectar la presencia de parásitos del género <i>Leishmania</i> en animales de interés pecuario.....	34
8.2.2.	Identificar las especies de parásitos del género <i>Leishmania</i> en animales de interés pecuario.....	34
8.2.3.	Determinar la prevalencia de parásitos del género <i>Leishmania</i> en animales de interés pecuario.....	34
IX.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
9.1.	Tipo de estudio.....	35
9.2.	Criterios de inclusión.....	35
9.3.	Criterios de exclusión.....	35

9.4.	Criterios de eliminación	35
9.5.	Colecta de muestras.....	35
9.6.	Extracción de ADN y detección molecular de <i>Leishmania</i>	36
9.7.	Identificación de especies de <i>Leishmania</i> por RFLP's	37
X.	RESULTADOS	38
10.1.	Detección de parásitos del género <i>Leishmania</i> en animales de interés pecuario	38
10.2.	Identificación de la (s) especie (s) de parásitos del género <i>Leishmania</i> en animales de interés pecuario	39
10.3.	Determinación de la prevalencia de parásitos del género <i>Leishmania</i> en animales de interés pecuario	40
XI.	ANALISIS Y DISCUSIÓN	41
XII.	CONCLUSIONES	45
XIII.	PERSPECTIVAS	46
XIV.	ANEXOS	47
14.1.	Consentimiento Informado.....	47
14.2.	Siglas y Abreviaciones.....	48
XV.	REFERENCIAS	49

I. INDICE DE CUADROS

Número	Descripción	Página
1.	ETD transmitidas a través de vectores	5

II. INDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
1	Morfología de <i>Leishmania spp.</i>	6
2	Leishmaniasis cutánea localizada	8
3	Leishmaniasis cutánea diseminada y difusa	9
4	Leishmaniasis mucocutanea	11
5	Leishmaniasis visceral	12
6	Distribución geográfica de Leishmaniasis	20
7	Distribución geográfica de Leishmaniasis en México	21
8	Taxonomía de parásitos <i>Leishmania spp</i>	22
9	Ciclo de vida de <i>Leishmaniaa spp.</i>	24
10	Distribución geográfica de especies de <i>Lutzomyia</i> en México	25
11	ADN de <i>L. mexicana</i> en <i>Culicoides furens</i>	26
12	Familias de mamíferos reservorios de parásitos del género <i>Leishmania</i> .	27
13	Detección ADN de <i>Leishmania spp.</i> mediante PCR	38
14	Identificación de la especie <i>L. mexicana</i> mediante RFLP	39
15	Muestras sanguíneas de animales de interés pecuario portadores de parásitos de <i>L. mexicana</i>	40

III. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una zoonosis causada por parásitos del género *Leishmania* que se encuentra catalogada como desatendida y prioritaria según la Organización Mundial de la Salud (OMS), posee una amplia distribución geográfica y se observa una mayor carga de la enfermedad en países de en vías de desarrollo (Savoia, 2015) Se han descrito tres variantes clínicas de la infección y su expresión dependerá de la especie infectante y de la respuesta inmunológica del hospedador, el cual podrá desarrollar Leishmaniasis cutánea (LC), Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o Leishmaniasis visceral (LV); sin embargo existen reportes donde un paciente puede desarrollar más de una variante clínica (Pace, 2014). Actualmente, se conoce que el agente causal de la enfermedad son parásitos del género *Leishmania* pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y son transmitidos por flebótomos hembra infectados del género *Lutzumya* en el nuevo mundo o *Phlebotomus* en el viejo mundo. Se han reportado alrededor de 53 especies de las cuales, más de 20 tienen capacidad de infección a humanos (de Vries *et al.*, 2015; Ishemgulova *et al.*, 2017).

La transmisión endémica de Leishmaniasis se ha reportado en 98 países distribuidos en 5 continentes (Alvar *et al.*, 2012) donde se estima que aproximadamente 350 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección y una tasa de incidencia anual de 1.3 millones de casos, además posee un índice importante de mortalidad, considerándose la segunda causa de muerte como enfermedad infecciosa (Von Stebut, 2007).

Respecto al continente Americano la distribución geográfica de esta enfermedad se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y existen reportes de 9 especies infectantes (Tolezano *et al.*, 2007); México es considerado un país endémico de Leishmaniasis, con registros de la infección en 17 entidades federativas y reportes de todas las variantes clínicas de la enfermedad, siendo LC causada por *L. mexicana* el caso clínico prominente (Arenas *et al.*, 2017). En el estado de Sinaloa existe registro de casos de LC desde el año 1994 (Castillo-Ureta *et al.*, 2019; Ochoa-Diaz *et al.*, 2012).

Existen estudios donde se reportan alrededor de 70 animales silvestres y domésticos que funcionan como reservorios en el ciclo de vida de parásitos (Esteva *et al.*, 2017), dentro de los cuales se encuentran especies como cánidos, roedores, marsupiales, hiracoideos, edentados e incluso seres humanos (Akhoundi *et al.*, 2016); En América existen reportes de alrededor de 52 especies de mamíferos infectados por *Leishmania* (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015), como didelphimorfos, pilosos, cingulados, roedores, félidos, canidos, primates y chiropteros; sin embargo, estos tipos de estudios de interacción huésped-parásito entre mamíferos silvestres y *Leishmania* no son comunes debido a la complejidad que implica realizarlos (Roque *et al.*, 2014). Respecto a México, a pesar de que el estudio de posibles reservorios está poco explorado, existen algunos reportes donde se vinculan a especies de roedores, pilosos, chiropteros, canidos y félidos como parte del ciclo de vida de *Leishmania* (Muñoz-García *et al.*, 2019; Roque *et al.*, 2014; Sanchez-Moreno *et al.*, 2015). El estado de Sinaloa se encuentra catalogado como endémico de Leishmaniasis y recientemente se reportó por

primera ocasión casos de Leishmaniasis canina autóctona en la localidad de Tecualilla, Escuinapa, (Castillo-Ureta *et al.*, 2019), aunado a que es un área donde la ganadería de traspatio se realiza de manera recurrente, se considera de gran importancia llevar a cabo estudios encaminados a la caracterización ecoepidemiológica para lograr identificar los componentes de transmisión del parásito (especies parasitarias, vectores y reservorios).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Enfermedades tropicales en el mundo

Dentro de las enfermedades tropicales, se encuentra un grupo de aproximadamente de 20 padecimientos a los que la Organización Mundial de la Salud (OMS) cataloga como Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) las cuales afectan a más de mil millones de personas a nivel mundial en 149 países del mundo (Varikuti *et al.*, 2018).

Debido al impacto que tienen estos padecimientos, la OMS y el Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales, esbozaron en sus publicaciones prioridades para infecciones tropicales desatendidas (Molyneux *et al.*, 2017). Por otro lado, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reporta que en 17 ETD (Cuadro 1) están involucrados vectores (OPS/OMS, 2021), los cuales pueden transmitir bacterias, helmintos, virus y protozoarios (Fenwick, 2012; Molyneux *et al.*, 2017).

Cuadro 1. ETD transmitidas a través de vectores

Chikungunya
Dengue
Ectoparasitosis
Enfermedad de Chagas
Esquistosomiasis
Fascioliasis
Filariasis linfática
Geohelmintiasis
Infección por virus del Zika
Leishmaniasis
Lepra
Oncocercosis
Paludismo
Teniasis
Cisticercosis por <i>Taenia solium</i>
Tracoma

Entre los protozoarios que desencadenan las ETD se encuentra *Leishmania spp.*, agente causal de la enfermedad de Leishmaniasis, la cual reporta un gran impacto económico debido a que en casos de la variante clínica LV supera el 20% de gasto total anual en los hogares de los infectados (Watts, 2017).

4.2. Agente etiológico *Leishmania spp.*

La Leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por distintas especies de protozoos del género *Leishmania* los cuales pertenecen a la familia Trypanosomatidae; estos parásitos son dimórficos, es decir que adoptan dos formas morfológicas durante su ciclo de vida; por un lado la forma infectiva la cual

es conocida como promastigote y se encuentra en el vector (Figura 1a) y la forma replicativa intracelular a la que se le conoce como amastigote (Figura 1b) la cual es encontrada en los organismos vertebrados que funcionan como reservorios (Pereira y Perez, 2002).

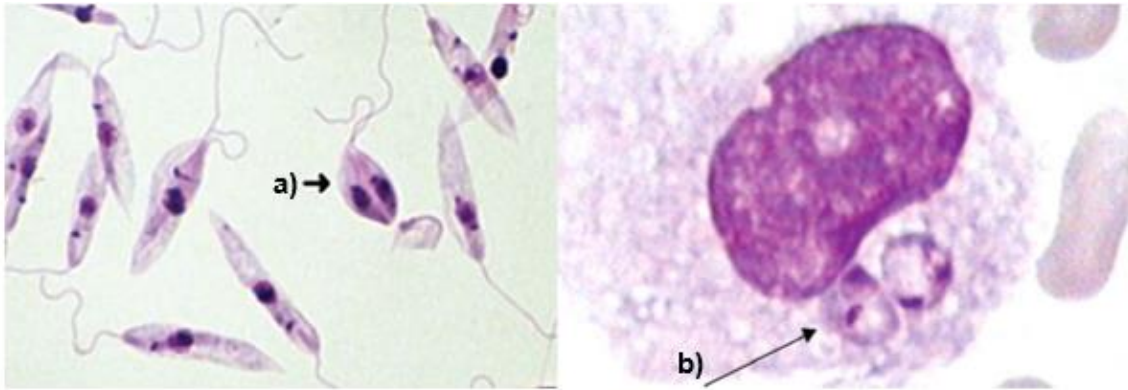


Figura 1. Morfología de *Leishmania spp.* a) Forma infectiva del parásito la cual es transmitida de vectores a hospederos conocida como promastigote, b) Forma replicativa intracelular observada mediante microscopía en el interior de células del sistema inmunológico del hospedero (Pereira y Perez, 2002).

Los promastigotes son transmitidos a través de flebótomos hembras infectadas a humanos o expuestos en ecosistemas donde conviven con vectores o reservorios sean estos peridomésticos o selváticos (Goto, 2012); se han reportado una gran variedad de animales que funcionan como reservorios de *Leishmania*, tal es el caso de perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas, cabras, caballos, burros, entre otros (Bravo-Barriga *et al.*, 2016; Mukhtar *et al.*, 2000). Actualmente se conocen aproximadamente 53 especies de *Leishmania* y, al menos 20 de ellas son patógenas para los humanos (Ishemgulova *et al.*, 2017).

4.2.1. Manifestaciones clínicas de leishmaniasis

Al adquirir la infección por parásitos del género *Leishmania* se pueden desarrollar tres tipos de variantes clínicas: Leishmaniasis visceral (LV), Leishmaniasis cutánea (CL), Leishmaniasis mucocutánea (MCL) y, sus manifestaciones clínicas pueden variar desde la cura espontánea de las lesiones en la piel hasta las fallas fatales de los órganos viscerales (Ishemgulova et al., 2017).

4.2.1.1. Leishmaniasis cutánea (LC):

La Organización Mundial de la Salud estima una incidencia anual de 0,7 - 1 millón casos de leishmaniasis cutánea alrededor del mundo, donde el 90% de estos casos ocurren en Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Argelia, Irán, Brasil y Perú. Los parásitos de *Leishmania* que causan esta variante clínica de la enfermedad se dividen comúnmente en especies del Viejo Mundo (*L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*), las cuales prevalecen alrededor de la cuenca del Mediterráneo, el Medio Oriente, el Cuerno de África, o el subcontinente indio; y especies del Nuevo Mundo (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*), que son endémicas en América Central y del Sur (Burza et al., 2018). En América la LC es endémica de 18 países desde México hasta Argentina (OPS, 2015) y se divide en leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea diseminada, leishmaniasis cutánea difusa (Lyra et al., 2020) y se estima que la tasa de incidencia anual es entre 187,200 a 307,800 casos (Alvar et al., 2012).

4.2.1.2. Leishmaniasis cutánea localizada

Las lesiones por LC localizada comienzan como una pequeña pápula en el sitio de la inoculación la cual incrementa su tamaño para evolucionar a un nódulo que se ulcera progresivamente (Figura 2); esta úlcera usualmente se cura por si sola en un lapso de tiempo de 3 a 18 meses, sin embargo en una pequeña porción de pacientes con LC las lesiones no mejoran en el periodo esperado y su infección pasa a ser considerada como crónica después de 2 años (Gurel *et al.*, 2020).



Figura 2. Leishmaniasis cutánea localizada. Lesión ubicada en el rostro de un paciente masculino, presentando bordes sobreelevados así como ulceración en el centro, característicos de Leishmaniasis cutánea localizada (Burza *et al.*, 2018).

4.2.1.3. Leishmaniasis cutánea diseminada

El cuadro clínico de esta variante de la enfermedad consiste en la coexistencia de varios tipos de lesiones cutáneas las cuales pueden ser variadas con al menos 10 lesiones en distintos segmentos corporales no contiguos, desde la cara hasta afectar fuertemente el tronco y las extremidades (Figura 3a); la afectación mucosa también es frecuentemente, observándose en casi la mitad de los casos. El desarrollo de la leishmaniasis diseminada es poco conocido y está relacionado con factores ambientales, respuesta inmunológica del hospedero y especie del parásito (Machado *et al.*, 2019).



Figura 3. Leishmaniasis cutánea diseminada y difusa. a) Lesiones características de Leishmaniasis cutánea diseminada en extremidad inferior; b) Lesiones ocasionadas por Leishmaniasis cutánea difusa caracterizada por nódulos no ulcerados (Mokni, 2019).

4.2.1.4. Leishmaniasis cutánea difusa

La leishmaniasis cutánea difusa se caracteriza por la presencia de nódulos indoloros que progresan lentamente y finalmente pueden afectar la mayor parte de la superficie cutánea, observándose principalmente en rostro, orejas, codos y rodillas (Figura 3b). Se estima que el 30% de pacientes con esta variante clínica tendrá afectación oral o nasofaríngea; Se considera como agente causal en el viejo mundo a la especie *L. aethiopica*, mientras que en el nuevo mundo esta variante clínica se asocia con *L. mexicana* (Handler *et al.*, 2015).

4.2.1.5. Leishmaniasis mucocutanea (LMC)

La leishmaniasis mucocutánea es generalmente causada por especies del subgénero *Viannia* como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Esta variante clínica de la enfermedad requiere tratamiento y es potencialmente mortal (David y Craft, 2009); se debe principalmente a una extensión o metástasis de la infección cutánea local al tejido mucocutáneo; esta variante clínica se puede presentar meses o años después de la resolución de las lesiones primarias y se trata de una infección desfigurante como resultado de destrucción local crónica de nariz, boca, orofaringe, nasofaringe y los párpados, la cual puede progresar hasta afectar la función respiratoria y dificultar la nutrición (Figura 4). La enfermedad suele ser resistente a la quimioterapia y los pacientes suelen morir por sobreinfecciones secundarias y desnutrición (McGwire y Satoskar, 2014).

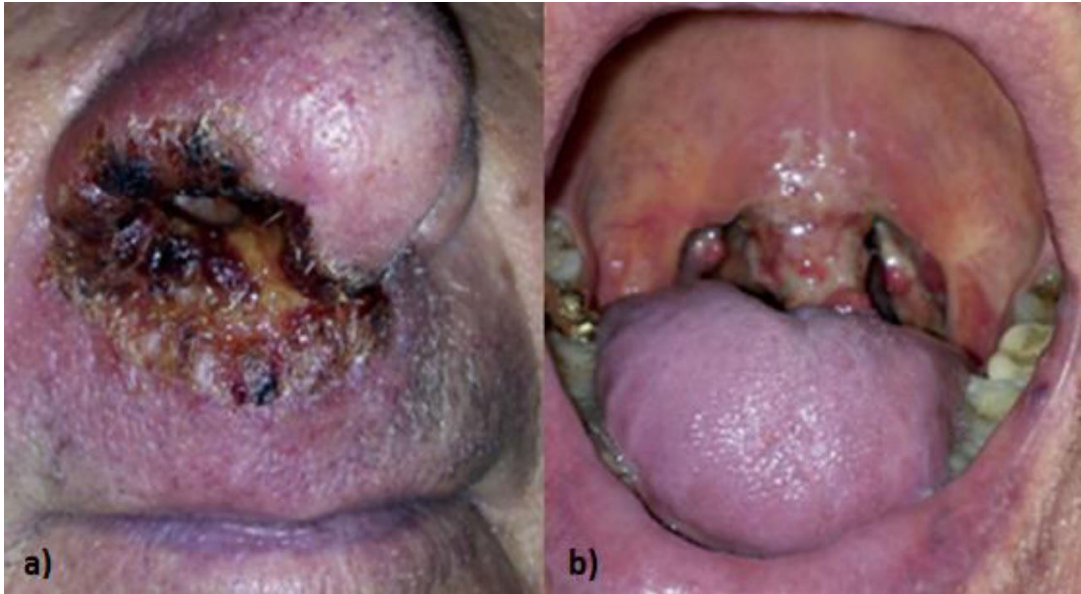


Figura 4. Leishmaniasis mucocutanea. Lesiones representativas de Leishmaniasis mucocutanea en un paciente masculino de 73 años de edad; a) Lesión en fosa nasal, labio superior y surco nasolabial. b) Lesión en úvula y blando adyacente (Burza *et al.*, 2018).

4.2.1.6. Leishmaniasis visceral (LV)

El cuadro clínico de esta enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progresiva y pérdida de peso (Chakravarty *et al.*, 2018). Los pacientes tienen un alto riesgo de infecciones adicionales como otitis media, infecciones gastrointestinales y neumonía, las cuales se complican fácilmente con sepsis (Figura 5); sin tratamiento, la LV es universalmente fatal (van Griensven y Diro, 2012).



Figura 5. Leishmaniasis visceral. Paciente con signos de esplenomegalia causada por Leishmaniasis visceral (van Griensven y Diro, 2012).

4.3. Diagnóstico

El diagnóstico de Leishmaniasis a menudo puede ser un desafío ya que esta enfermedad tiene muchas manifestaciones clínicas que pudieran ser similares a las de una gran variedad de infecciones y para la diferenciación entre ellas se podría requerir una evaluación parasitológica, inmunológica, histopatológica, inmunopatológica y moleculares, incluso, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) recomienda usar varias técnicas y

obtener múltiples muestras de diferentes lesiones, para aumentar la sensibilidad de detección (Handler *et al.*, 2015).

4.3.1. Diagnóstico parasitológico

Este tipo de diagnóstico se realiza mediante frotis, cultivo o xenodiagnóstico, siendo el examen microscópico directo de raspados de lesiones teñidos con Giemsa el método más adecuado para el diagnóstico definitivo de leishmaniasis (Ramirez *et al.*, 2000). Una vez obtenida la muestra, la cual es tomada generalmente del borde indurado de la úlcera, se procede a observar mediante microscopía y deberá examinarse durante al menos 1 hora en busca del parásito; sin embargo, aun con la experiencia del personal, pudiera haber falsos negativos dependiendo de la carga parasitaria la cual puede ser baja debido a tratamientos previos (Alvar *et al.*, 2008).

4.3.2. Cultivo

Los métodos de cultivo tradicionales consisten en un sistema de cultivo bifásico de agar sangre con recubrimiento líquido la cual se muestrea periódicamente durante la incubación para detectar la presencia de parásitos en su forma promastigote; en algunas ocasiones se necesita una incubación prolongada para la obtención de un gran número de amastigotes y lograr un resultado positivo (Boggild *et al.*, 2007); En el caso de leishmania, las técnicas de cultivo requieren un ambiente *in vitro* para lograr que un pequeño número de amastigotes se conviertan rápidamente en una población numerosa de promastigotes móviles visibles en microscopio. Dentro de los métodos de cultivo más utilizados se encuentran el método de cultivo

microcapilar (MCM) el cual es más sencillo y sensible que los cultivos convencionales de Novy, McNeal, Nicolle (Allahverdiyev *et al.*, 2004).

4.3.3. Diagnóstico histológico

El diagnóstico histopatológico es importante ya que permite observar el parásito y además estudiar el infiltrado inflamatorio que se produce durante la infección por parásitos del género *Leishmania* (K. González *et al.*, 2018). En pacientes con lesiones activas normalmente se observan dos patrones histológicos: en primera instancia la reacción inflamatoria crónica inespecífica, infiltrado difuso compuesto por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, granulocitos y detritos celulares; por otro lado la reacción granulomatosa, con el mismo patrón mencionado anteriormente asociado con células epiteloides y formación de granulomas (Schubach *et al.*, 2001).

4.3.4. Diagnóstico inmunológico

En el diagnóstico inmunológico podemos encontrar diversas técnicas como la prueba de Montenegro, serología, inmunocomatina e *immunoblotting*, las cuales a la detección de parásitos en muestras de biopsias, ya que se han desarrollado técnicas inmunológicas para demostrar procesos de la respuesta inmune humoral o mediadas por células contra *Leishmania* como medio de diagnóstico y estudio epidemiológico; sin embargo la especificidad depende de diversas cuestiones como la fuente y pureza del antígeno empleado ya que algunos antígenos de *Leishmania* tienen epítomos de reacción cruzada comunes con otros microorganismos (Kar, 1995).

4.3.5. Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares cada día son más utilizados para el diagnóstico de enfermedades y estudios epidemiológicos debido a que estas pruebas pueden realizarse e interpretarse rápidamente y con alta sensibilidad y especificidad (Conter *et al.*, 2019). El diagnóstico molecular puede realizarse mediante técnicas como PCR convencional, PCR tiempo real, análisis de longitud de los fragmentos de restricción del producto amplificado (RFLP), electroforesis de enzimas múltiples locus (MLEE), estudio de ADN polimórfico amplificado al azar, análisis de disociación de alta resolución (HRM), *OligoC-Test* para *Leishmania* y ensayo basado en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) con oligocromatografía; considerándose la PCR de las técnicas más comunes y disponibles (Ríos *et al.*, 2010) (Ampuero *et al.*, 2009).

4.4. Tratamiento

Actualmente se conocen algunos fármacos que se prescriben para Leishmaniasis como los antimoniales, los cuales se consideran medicamentos de primera línea contra la enfermedad ya que es la base de la quimioterapia antileishmania; por otro lado se utilizan fármacos de segunda línea como antofericina B y miltefosina, esta última también utilizada en otros padecimientos como cáncer. Sin embargo existen algunos inconvenientes en las terapias empleadas contra esta enfermedad tales como la citotoxicidad, la resistencia que el parásito logra desarrollar a los fármacos (Taslimi *et al.*, 2018; Toghueo, 2019), además de los altos costos y la larga duración de algunos tratamientos. Estos inconvenientes no han hecho posible que

la farmacoterapia sea un método eficaz para erradicar la enfermedad (Ghorbani y Farhoudi, 2018).

4.4.1. Antimoniales

Los antimoniales se consideran la primera línea de defensa contra *Leishmania* desde hace 60 años y actúan sobre la forma amastigote del parásito. La primera vez que se utilizó fue en 1920 mostrando una tasa de curación clínica del 90% en LV en pacientes la India; con el paso del tiempo la resistencia al medicamento fue creciendo, lo que ocasionó una rápida propagación de cepas resistentes por lo que el fármaco fue prohibido en este país, sin embargo sigue siendo utilizado en el resto de las regiones endémicas del mundo. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) recomienda posibles dosis diarias que van desde los 10 a 20 mg/kg durante un periodo de tiempo variado que va desde unos pocos días hasta un máximo de 3 semanas (Navin *et al.*, 1992).

4.4.2. Miltefosina

Este fármaco el primer y único leishmanicida disponible por vía oral, su desarrollo en primera instancia fue como un agente antineoplásico. Tiene una licencia en la India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y también se puede usar para tratar enfermedades cutáneas. En lo que respecta al mecanismo de acción, tradicionalmente la miltefosina se ha considerado un inhibidor de la proteína quinasa B en humanos la cual forma parte de una vía de señalización implicada en la inducción de apoptosis; sin embargo, no se han observado vías similares en *Leishmania*, por lo que existen otras teorías sobre el mecanismo de acción frente

al parásito que incluye alteraciones en el contenido de lípidos de la membrana y modulación de las respuestas de los macrófagos, aunque claramente este último no estaría involucrado en las respuestas de fase de promastigote (Vincent *et al.*, 2014).

4.4.3. Paramomicina

La paromomicina (aminosidina) es un aminociclitol aminoglicosídico de amplio espectro y eficaz contra una amplia gama de bacterias y protozoos. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de síntesis de proteínas protozoarias, uniéndose a la subunidad ribosómica 30S e interfiriendo con el inicio de la síntesis al fijar el complejo ribosómico 30S-50S en el codón de inicio del ARNm; también conduce a una mala lectura del ARNm, por lo que se incorporan aminoácidos incorrectos en las cadenas de polipéptidos en crecimiento (Sundar y Chakravarty, 2008).

Los resultados de ensayos de fase III contra *Leishmania* realizados en la India mostraron eficacia y seguridad en la salud de los pacientes ya que no se observó nefrotóxicidad, se encontró ototoxicidad de tono alto reversible (daño en el oído interno) en el 2% de los pacientes y el 1,8% de los pacientes mostró un aumento significativo (> cinco veces) de las transaminasas hepáticas; además de esto, otra ventaja de este fármaco es su bajo costo (entre 5 y 10 dólares por tratamiento) (Chappuis *et al.*, 2007).

4.4.4. Anfotericina B

Este fármaco se emplea como segunda para el tratamiento de casos de LC y LV (Lemke *et al.*, 2005). Estudios demuestran que el mecanismo de acción es a través de la interacción con esteroides y desarrollo de poros en la bicapa de la membrana lo que resulta en la destrucción de esta debido a la toxicidad de la célula del hospedero; sin embargo los efectos como nefrotoxicidad severa y toxicidad hematológica, hemólisis, daño hepático, náuseas, fiebre y otros limitan su uso clínico (Mehrizi *et al.*, 2019).

4.4.5. Imidazol

Existe una gran necesidad de encontrar fármacos contra *Leishmania* con menor toxicidad y mayor eficacia, por ello se desarrollan estrategias y enfoques para encontrarlos; los azoles (imidazoles y triazoles) se utilizan en infecciones fúngicas y se ha reportado en estudios recientes su eficacia contra parásitos del género *Leishmania*. Se han evaluado azoles como ketoconazol y fluconazol, revelando mayor eficacia y curación de la úlcera con fluconazol (Shokri *et al.*, 2018).

Los imidazoles inhiben la síntesis de ergosterol, componente esencial de la membrana celular bloqueando específicamente la enzima esteroide 14 α -desmetilasa (CYP51) del citocromo P450 (CYP450), conduciendo a la interrupción de la conversión de lanosterol a ergosterol, además de interferir con la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos provocando la acumulación de peróxido de hidrógeno dentro de las células teniendo como resultado necrosis y muerte celular (Shokri *et al.*, 2018).

4.5. Epidemiología

La Leishmaniasis es endémica de regiones tropicales y subtropicales, ha sido reportada en 98 países de todos los continentes (Figura 6), con alrededor de 350 millones de personas en riesgo y 2 millones de casos nuevos anuales según informes de la OMS (Andrade-Narvaez *et al.*, 2016; Jorjani *et al.*, 2019). Se sitúa en el segundo lugar en mortalidad y en la cuarta en morbilidad en todo el mundo (Handler *et al.*, 2015) y se clasifican de acuerdo a la región del mundo donde ocurre. La Leishmaniasis del viejo mundo (OW) se encuentra en el Hemisferio Oriental y es endémica en Asia, África y Sur de Europa, mientras que la del nuevo mundo (NW) pertenece al Hemisferio Occidental y se extiende desde el centro-sur de Texas hasta Centro y Sur América, excepto en Chile y Uruguay (Kevric *et al.*, 2015); donde existen reportes de los agentes causales *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. infatum*, *L. peruviana*, *L. naiffi*, *L. pifanoi*, *L. garnhami*, *L. shawi*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* (Cantacessi *et al.*, 2015).

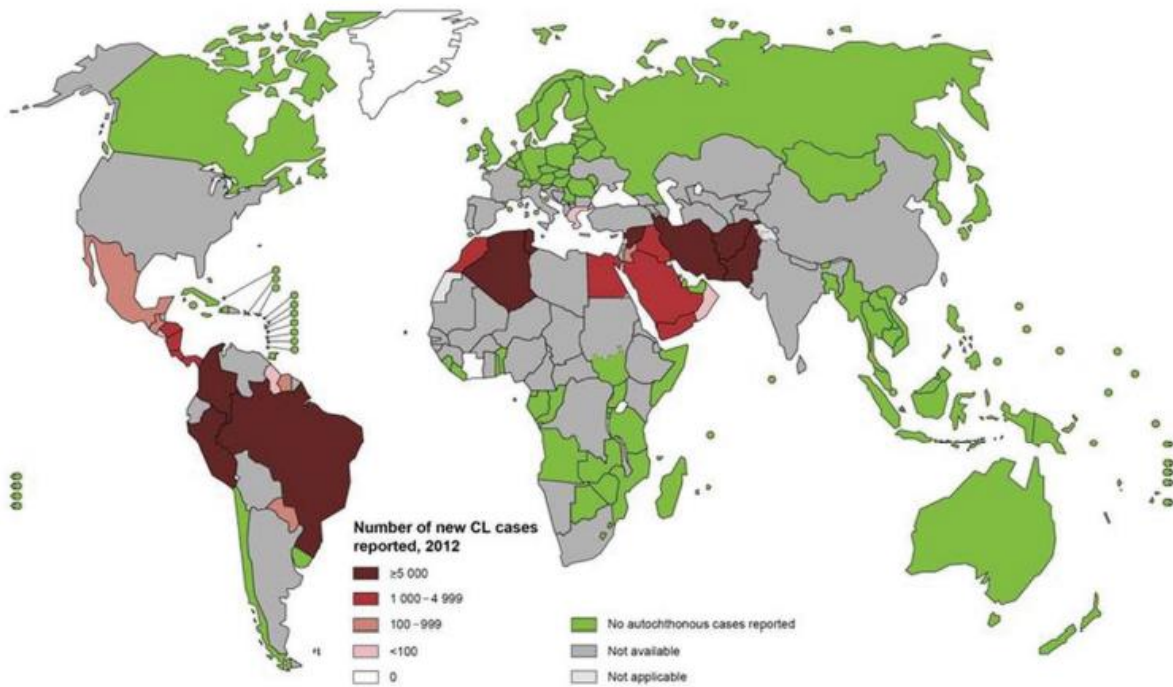


Figura 6. Distribución geográfica de Leishmaniasis. (Von Stebut, 2015).

En el continente americano se estima un promedio de 56,000 casos de LC y LMC y 3800 casos de LV anuales. Además, la LC se ha registrado en 20 países, de los cuales se consideran endémicos Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México (OPS/OMS, 2021).

En México existen registros de *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. mexicana* siendo esta última la causante de LC en humanos en los 17 estados, incluyendo Campeche, Chiapas, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán, Durango y Sinaloa; LV se he reportado en los estados de Guerrero y Morelos, mientras que la LMC en

Tabasco y Chiapas como se puede observar en la Figura 7 (Castillo-Ureta *et al.*, 2019; Ochoa-Díaz *et al.*, 2012).

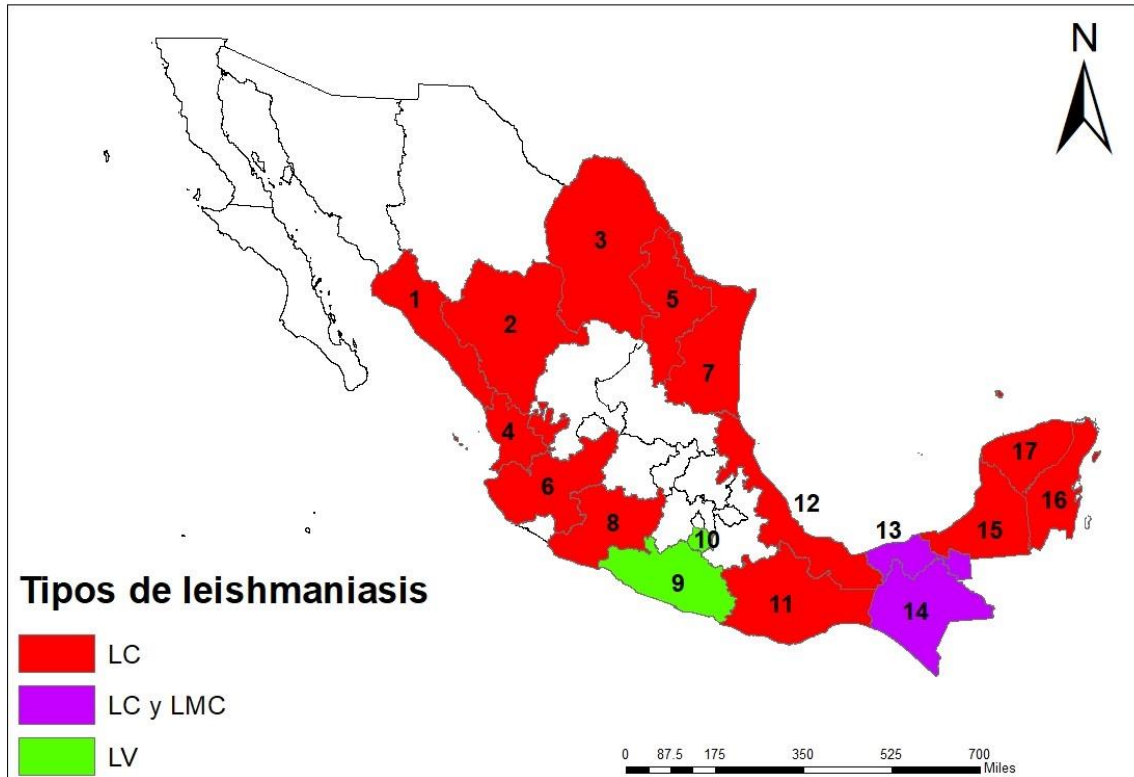


Figura 7. Distribución geográfica de Leishmaniasis en México. LC: Leishmaniasis cutánea, LMC: Leishmaniasis mucocutánea, LV: Leishmaniasis visceral. 1: Sinaloa, 2: Durango, 3: Coahuila, 4: Nayarit, 5: Nuevo León, 6: Jalisco, 7: Tamaulipas, 8: Michoacán, 9: Guerrero, 10: Morelos, 11: Oaxaca, 12: Veracruz, 13: Tabasco, 14: Chiapas, 15: Campeche, 16: Quintana Roo, 17: Yucatán.

De acuerdo a la tasa de incidencia anual y números de casos de Leishmaniasis visceral y cutánea en 2015 (OMS, 2017) en México se presentaron aproximadamente 1 y 479 casos respectivamente (Marcondes y Day, 2019) mientras que en el estado de Sinaloa de 1994 a la semana epidemiológica número 53 del año 2020, se reportaron 128 casos acumulados de LC (SINAVE, 2020).

4.5.1. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*

En un inicio la clasificación taxonómica de *Leishmania* se basaba en criterios ecobiológicos como distribución geográfica, propiedades antigénicas o manifestaciones clínicas; sin embargo, al utilizarse técnicas moleculares se obtuvo como resultado un aumento masivo del número de especies descritas, por lo que la OMS publicó un nuevo esquema taxonómico en el año de 1990 (Figura 8), describiéndose que el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia* en los cuales se albergan 20 especies de importancia médica por su patogenicidad en seres humanos (Bañuls et al., 2007).

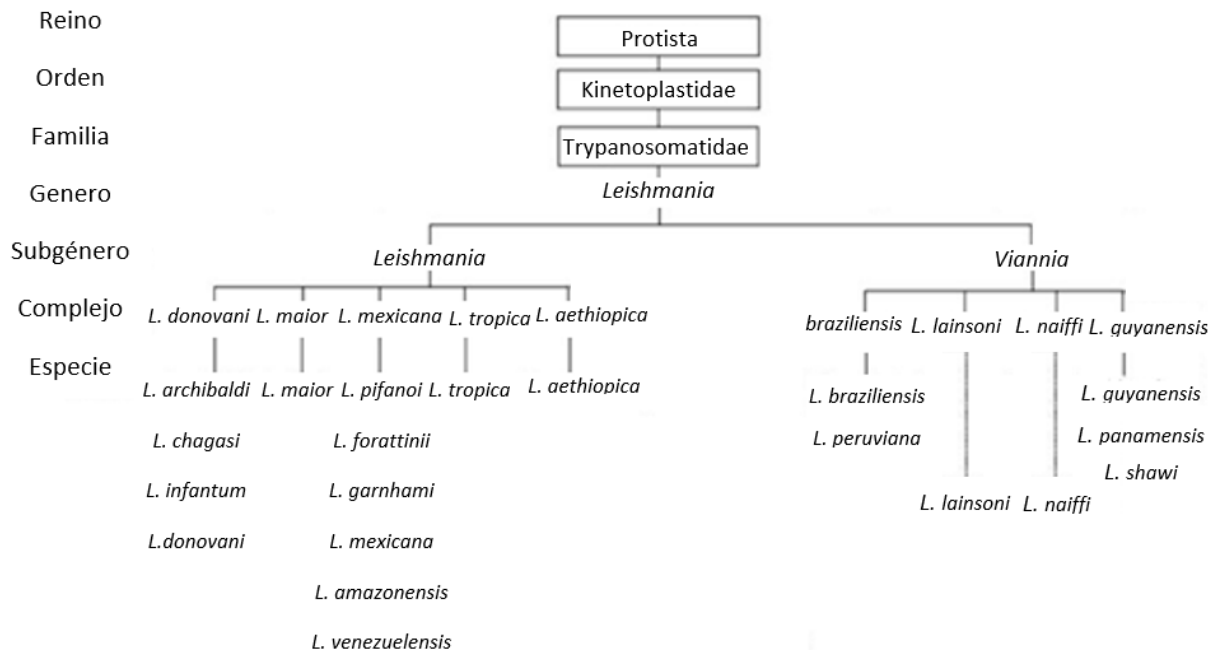


Figura 8. Taxonomía de parásitos *Leishmania* (Bañuls et al., 2007).

4.5.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los protozoarios del género *Leishmania* es heteroxeno ya que se completa en dos organismos; por un lado se encuentra el vector, que en este caso es díptero hematófago hembra quien transmite la forma promastigote flagelada del parásito, y el hospedero vertebrado donde el promastigote adquiere la forma replicativa intracelular llamada amastigote y utiliza a las células del sistema inmunológico para replicarse y posteriormente provocar lisis celular, teniendo oportunidad de infectar otras células (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

El ciclo es completado cuando el vector ingiere los amastigotes al alimentarse del hospedero infectado, los cuales adquieren la forma promastigote flagelada en el intestino del díptero para posteriormente migrar a la región del probóscide y siendo inoculados en otro organismo vertebrado en la siguiente toma de alimento del vector (Kevric *et al.*, 2015) como se describe en la figura 9.

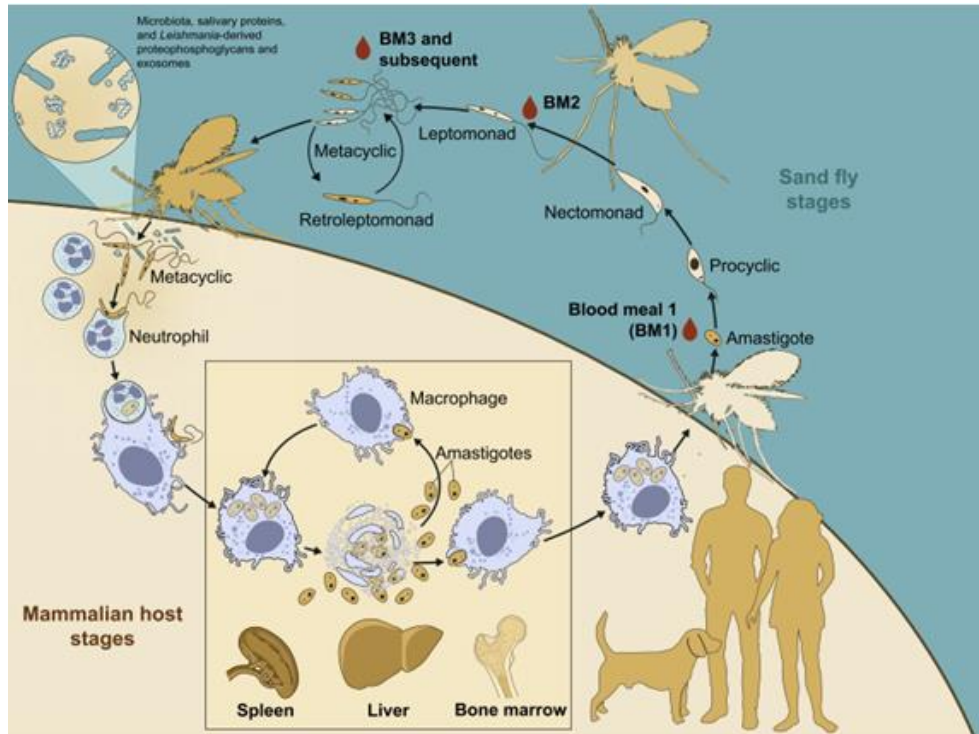


Figura 9. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Mcgwire y Satoskar, 2014).

4.6. Vectores

Los flebótomos hembras responsables de la transmisión de *Leishmania* son incluidos en la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae y se reconocen seis géneros de los cuales dos se consideran de importancia médica: *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (Killick-Kendrick, 1999). Se estima que 93 especies de las 800 conocidas de estos flebótomos participan en el ciclo de vida del parásito propagando la infección principalmente en meses de verano, al aire libre desde el anochecer hasta el amanecer (Pace, 2014).

En México se han realizado estudios con el fin de identificar las especies de flebótomos responsables de la propagación de la infección, identificándose las especies *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia longipalpis*, *Psathyromyia shannoni*,

Dampfomyia deleoni, *Dampfomyia beltrani/steatopyga*, *Bichromomyia olmeca olmeca/Lutzomyia olmeca*, *Brumptomyia mesa* (Adeniran et al., 2019; Lozano-Sardaneta et al., 2020), *Lutzomyia gomezi*, *Nyssomyia ylephiletor*, *Psychodopygus panamensis*, *Pintomyia ovallesi*, *Pintomyia evansi* y *Dampfomyia anthophora* (Osorio, 2015); de las cuales las de mayor importancia médica son las descritas en la Figura 10 (C. González et al., 2011).

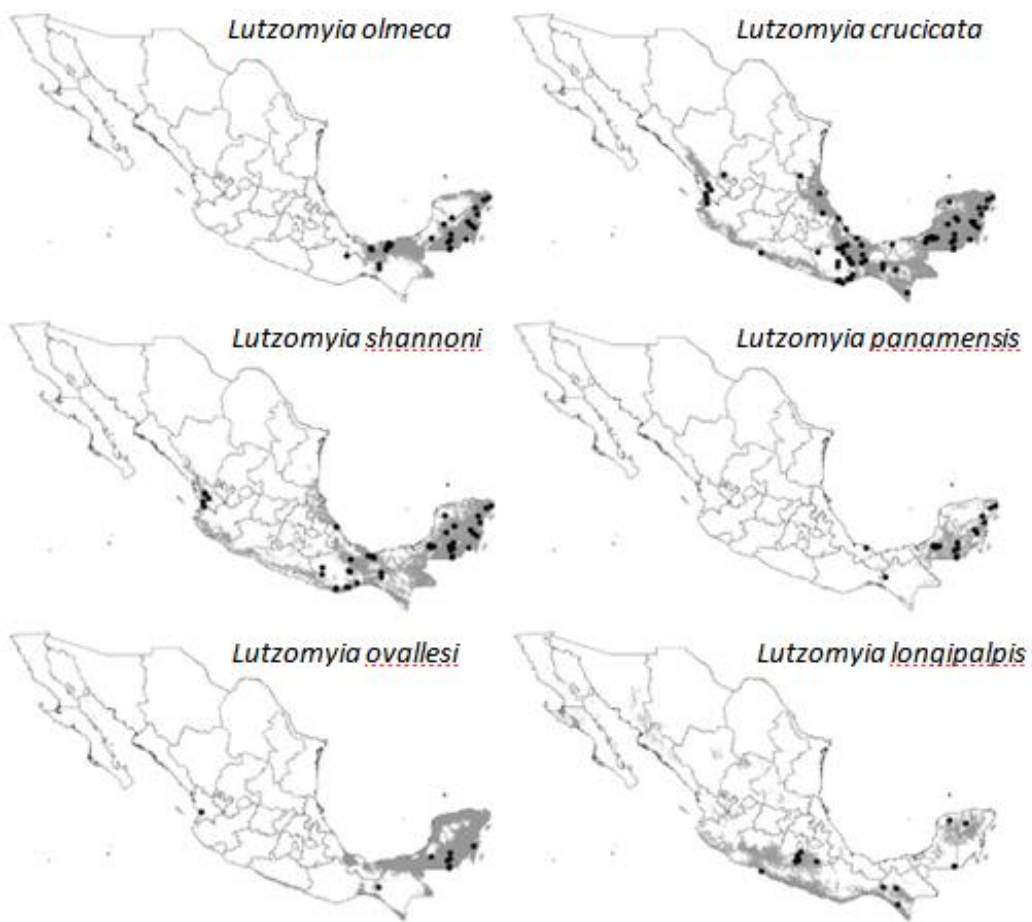


Figura 10. Distribución geográfica de especies de *Lutzomyia*. Los puntos negros indican la ocurrencia conocida de las especies con importancia médica; el área en gris corresponde a predicciones de distribución para los vectores (C. González et al., 2011).

En Sinaloa no existen registros de especies de vectores que transmitan parásitos del género *Leishmania*, sin embargo recientemente fue publicado por primera ocasión que la especie *Culicoides furens* la cual fue identificada morfológicamente (Figura 11a) era portador de parásitos del género *Leishmania spp*, los cuales al ser sometidos a técnicas moleculares fueron identificados como *L. mexicana*, como se ilustra en la Figura 11b (Ríos-Tostado *et al.*, 2021).

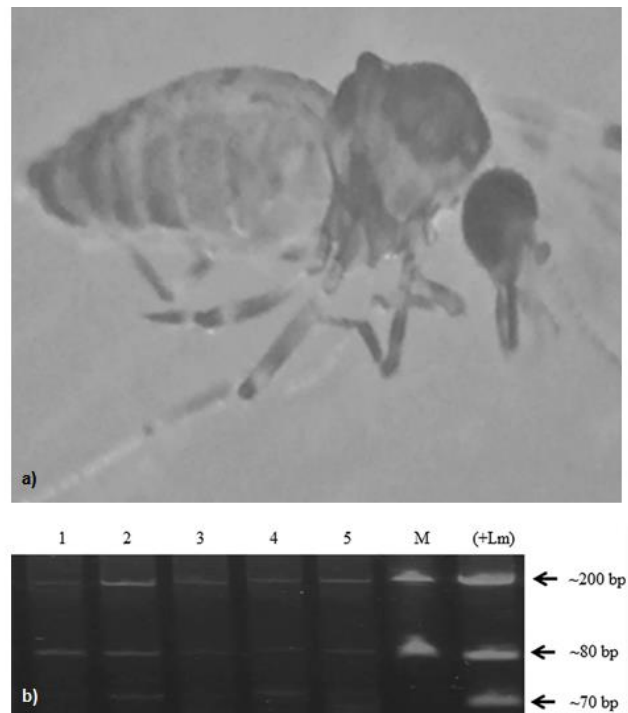


Figura 11. ADN de *L. mexicana* en *Culicoides Furens*. a) Identificación morfológica de *Culicoides furens* donde se observa una vista lateral de flebótomo hembra. b) Restricción enzimática de ADN de parásitos aislados en *Culicoides furens* muestra positividad a *L. mexicana*. +Lm: Cepa de referencia utilizada como control positivo de *L. mexicana*, M: Marcador de peso molecular de 100 pb, 1-5 muestras positivas a ADN de *L. mexicana*.

4.7. Reservorios silvestres

Dentro de los animales de vida silvestre reportados como reservorios de *Leishmania* se encuentran roedores (*Akodon*, *Akomys*, *Arvicanthis* *Coendoués*, *Dasyprocta*, *Equímidos*, *Gerbil*, *Heteromys*, *Hydrochoerus*, *Hoplomys*, *Neacomys*, *Neotomas*, *Nyctomys*, *Orizomys*, *Otodylomys*, *Peromyscus*, *Phyllotis*, *Porcupine*, *Proechymis*, *Psamommys*, *Rhipidomys*, *Sigmodon*, *Zygodontomys*), Carnivora (*Canidos*, *Procyonoide*, *Félidos*), Hiracoideos (*Dendrohyrax*, *Procavia*) Cingulados (*Dasyopus*) Ungulados (*Suidos*, *equinos*, *bóvidos*), Marsupiales (*Didelphidae*), Pilosos (*Filivoros*, *Tamandua*, *Macropodidae*) (Figura 12), además de otros ordenes como *Perissodactyla*, *Xenartha*, *Hyracoidea*, y *Lagomorfa* (Akhoundi *et al.*, 2016).

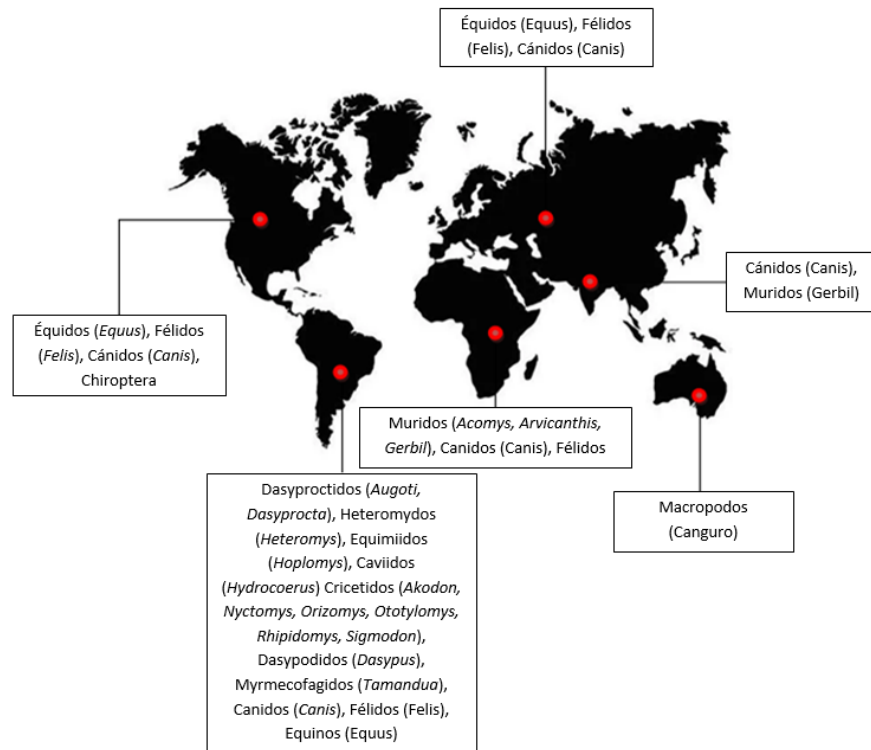


Figura 12. Familias de mamíferos reservorios de parásitos del género *Leishmania*. Entre paréntesis se ubican los géneros reportados.

En México, se han logrado vincular como hospederos de *Leishmania* a algunos animales silvestres, destacando diversas especies de murciélagos, las cuales desarrollan lesiones cutáneas; así mismo, se detectó que el agente causal de la infección es *L. mexicana* (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015); Sin embargo no se ha encontrado evidencia científica que permita conocer más sobre los animales silvestres que participen en el ciclo biológico de estos parásitos.

4.8.Reservorios domésticos

Se considera que gatos (*Felis catus*) son resistentes a la leishmaniasis ya que no presentan signos clínicos y los títulos de anticuerpos contra *Leishmania* son bajos, lo que se atribuye a una capacidad de generar anticuerpos específicos frente al patógeno sin sufrir la enfermedad. Existen reportes comparativos de una región endémica de Brasil, donde encontraron una positividad en 5.76% de gatos contra una prevalencia de leishmaniasis canina de 64.6; sin embargo esta diferencia significativa puede deberse a la falta de estudios en esta especie animal (Longoni *et al.*, 2012).

Por otro lado, perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) se consideran hospederos de importancia epidemiológica debido a su abundancia en el entorno peridomiciliar, el contacto directo que tienen con humanos y con otras especies que pudieran fungir como hospederos silvestres o con los vectores de parásitos *Leishmania* tanto en zonas rurales como urbanas (Ascencio *et al.*, 2020; Zamora-Ledesma *et al.*, 2020). Las manifestaciones clínicas que desarrollan puede ser desde una infección crónica sin signos clínicos que puede durar años hasta una

enfermedad grave que puede llevar a la muerte, por ello, la detección precoz de los perros infectados, su estrecha vigilancia y tratamiento son fundamentales para controlar la diseminación del parásito entre otros perros, siendo también un elemento fundamental para el control de la leishmaniosis zoonótica humana (Maia y Campino, 2018). En Sinaloa se ha reportado recientemente el primer caso de leishmaniasis canina autóctona, donde muestras sanguíneas de 3 perros que mostraban signos clínicos de la enfermedad fueron analizadas obteniendo resultados positivos a infección por *L. mexicana*. Este hallazgo se considera de gran importancia debido a que al ser un caso autóctono se encuentran en el lugar todos los elementos para la propagación de la enfermedad (Castillo-Ureta *et al.*, 2019).

4.9. Reservorios de interés pecuario

Los animales de interés pecuario han sido estudiados alrededor del mundo especialmente en especial en zonas endémicas de la enfermedad donde generalmente se registran casos de Leishmaniasis canina, con la finalidad de conocer en qué medida los animales domésticos distintos a los cánidos podrían fungir como reservorios (Gao *et al.*, 2015).

Existen reportes donde describen que equinos desarrollan signos cutáneos característicos de leishmaniasis como pápulas, nódulos, úlceras y/o costras localizadas principalmente en cabeza y extremidades (Limeira *et al.*, 2019); así también, se ha vinculado a borregos como reservorios de parásitos del género *Leishmania*, reportándose una incidencia hasta del 54% (Han *et al.*, 2018).

Por otro lado, se han realizado estudios donde se analizan las distintas fuentes de alimentación de los flebótomos, obteniendo como resultados que algunas especies de vectores se alimentan de borregos, burros, cabras, cerdos, gallinas, pavos, vacas (Chen et al., 2020; Remadi et al., 2020).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen reportes alrededor del mundo los cuales vinculan a animales de interés pecuario como reservorios naturales de *Leishmania spp.*, principalmente en zonas endémicas de la enfermedad. Aunque México se considera un país endémico de Leishmaniasis, actualmente se desconoce el papel que pudieran desarrollar los animales de interés pecuario en el ciclo de vida de estos parásitos; sin embargo en Sinaloa, en la localidad de Tecualilla, Escuinapa recientemente fueron reportados por primera ocasión casos de leishmaniasis canina autóctona, así como la presencia de *Leishmania mexicana* en flebótomos recolectados en la entidad; esto aunado a que el área de estudio se consideran zona endémica de Leishmaniasis nos permite sugerir que en ella se cuenta con condiciones favorables para que parásitos del género *Leishmania* puedan llevar a cabo su ciclo de vida y posiblemente los animales de interés pecuario desarrollan el papel de reservorios en este.

VI. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una zoonosis parasitaria que causa 30 mil defunciones al año alrededor del mundo, aproximadamente. Se reporta una tasa de incidencia anual de 2 millones de casos y alrededor de 350 millones de personas en riesgo de adquirir la infección. Actualmente, se han identificado 70 especies de animales domésticos y silvestres que funcionan como reservorios de parásitos del género *Leishmania*, entre los que destacan animales de interés pecuario.

Sinaloa es un estado endémico de Leishmaniasis donde la ganadería de traspatio se realiza de manera recurrente como sustento a las familias. El hecho que los animales funcionen como reservorios podría representar grandes pérdidas económicas para los propietarios y la población en general; así como, un riesgo importante para la salud de los habitantes de la región. Debido a lo anterior, se considera de vital importancia la implementación de estrategias encaminadas a la identificación de animales de interés ganadero como posibles reservorios de *Leishmania spp.*, en la localidad de Tecualilla, Escuinapa, Sinaloa, lo que permitirá establecer medidas para el control epidemiológico de la infección y así disminuir los riesgos zoonóticos a los que la población se encuentra expuesta.

VII. HIPÓTESIS

Parásitos del género *Leishmania* se encuentran circulando en sangre periférica de animales de interés pecuario pertenecientes a la localidad de Tecualilla, Escuinapa, Sinaloa.

VIII. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Detectar e identificar parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario en Tecualilla, Escuinapa, Sinaloa, México.

8.2. Objetivos específicos

- 8.2.1. Detectar la presencia de parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario.
- 8.2.2. Identificar las especies de parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario.
- 8.2.3. Determinar la prevalencia de parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Tipo de estudio

Observacional, descriptivo y transversal.

9.2. Criterios de inclusión

Se incluirán todos los animales de interés pecuario pertenecientes al grupo de ungulados con al menos tres meses en la localidad y cuyos propietarios firmen el consentimiento o asentimiento informado.

9.3. Criterios de exclusión

El criterio de exclusión se aplicará a animales sometidos a sistemas de reproducción intensiva.

9.4. Criterios de eliminación

Se eliminarán las muestras que resulten insuficientes o que se degraden.

9.5. Colecta de muestras

Se recabaron muestras sanguíneas en la localidad de Tecualilla, Escuinapa, Sinaloa (24° 45'55' 'N, 107° 42' 7" W) por conveniencia de equinos, bóvidos y suidos residentes del área de estudio por lo menos tres meses antes de la toma de muestra la cual fue por venopunción en la yugular, con previo consentimiento de los dueños; para ello se utilizaron jeringas de 3 mililitros (21 x 32) y las

muestras fueron colocadas en tubos con EDTA (tapa lila), se dejaron reposar durante 30 minutos y fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa donde se mantuvieron a -20°C hasta proceder con la extracción de ADN.

9.6. Extracción de ADN y detección molecular de *Leishmania*

El ADN genómico se extrajo a partir de las muestras de sangre colectadas con el kit Genomic DNA Purification System (Promega/ Madison, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante; se realizó una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) punto final para la detección de *Leishmania* spp. con los oligonucleótidos sentido LITSR (5'-CTGGATCATTTCGATG-3', 10 pMol) y el anti-sentido L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3',) que amplifican una región parcial de aproximadamente 350 pb del gen que codifica para el Espaciador Interno Transcrito 1 (ITS-1) del ADN ribosomal (ADNr) de *Leishmania* spp. (Bensoussan *et al.*, 2006). Para la mezcla de amplificación por PCR se utilizó el estuche comercial *GoTaq Green Master Mix* (Promega/ Madison, USA) y consistió en un volumen final de 12.5 µl que contenía 6.25 µl de PCR mix, 0.5 µl de cada oligonucleótido (10 pMol), 1 µl de ADN y 4.25 µl de agua libre de nucleasas.

La reacción de PCR se amplificó de acuerdo a Bensoussan *et al.* (2006) como se describe a continuación: 4 min de desnaturalización a 95°C, 34 ciclos (95°C por 40 s, 50°C por 40 s y 72°C por 50s) y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR, previamente teñidos con Gelred^(R) se analizaron por

electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 90 Vts por 40 min. Se visualizarán en un fotodocumentador GelDoc (BioRad).

9.7. Identificación de especies de *Leishmania* por RFLP's

Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega/ Madison, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados fueron sometidos a una reacción de digestión con la enzima de restricción HaeIII (Promega/ Madison, USA) como se describe en otros estudios (Ochoa-Diaz *et al.*, 2012); se añadió a los productos de PCR 0.5 µl de enzima HaeIII y se incubaron durante 3 horas a 37°C, posteriormente los fragmentos de restricción fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% previamente teñidos con Gel Red (Biotium/California, USA) y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc™ XR Universal Hood II (BioRad/ California, USA). Para identificar la especie de *Leishmania*, los patrones RFLP del ITS-1 fueron comparados con DNA de promastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/92/UAY68 aislada de pacientes con LC donada por Dra. Patricia Talamas Rohana del CINVESTAV-IPN.

X. RESULTADOS

10.1. Detección de parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario

Fueron recolectadas un total 35 muestras de sangre, de las cuales 24 correspondieron a equinos, 9 a bóvidos y 2 suidos.

En lo que respecta a la detección de parásitos del género *Leishmania* se logró observar mediante la amplificación mediante la técnica de PCR y electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, una banda de aproximadamente 350 pb la cual coincide con la banda de nuestra cepa de referencia, indicando la circulación en sangre periférica de ADN de *Leishmania* (Figura 13).

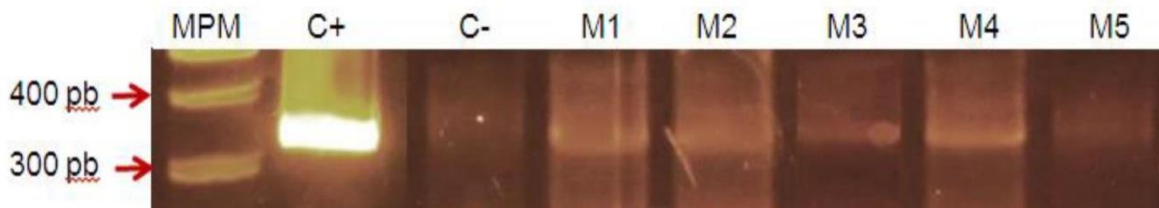


Figura 13. Detección de ADN de *Leishmania spp.* mediante PCR. Electroforesis del producto obtenido por PCR. MPM:marcador de peso molecular, C+: control positivo de *Leishmania spp.*, C-: control negativo, M1-M5: Muestras de sangre analizadas positivas para *Leishmania spp.*

10.2. Identificación de la (s) especie (s) de parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario

La identificación de la especie(s) de parásito(s) se llevó a cabo a través de la digestión enzimática de los productos de PCR con la enzima de restricción *HaeIII*, posteriormente al visualizarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% donde en el carril número 1 ubicamos el marcador de peso molecular de 100 pb, en el carril 2 la cepa de referencia de *Leishmania mexicana* utilizada como control positivo, posteriormente en el carril 3 se ubica nuestro control negativo y del carril 4 al 9 ubicamos muestras representativas; como puede observarse, el patrón de bandeo obtenido fue de aproximadamente de 60, 80 y 200 pb, el cual coincide con el patrón de bandeo de la cepa de referencia utilizada para *L. mexicana* en todas las especies de interés pecuario involucradas en el presente estudio, indicando que el agente causal de la infección es *L. mexicana* (Figura 14).

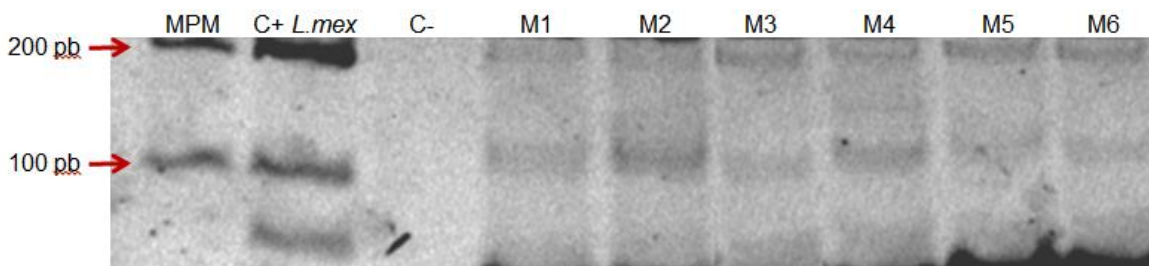


Figura 14. Identificación de la especie *L. mexicana* mediante RFLP. Electroforesis del producto obtenido mediante restricción enzimática con la enzima *HaeIII*. PM: marcador de peso molecular, C+ *L.mex* : control positivo de *Leishmania mexicana*., C-: control negativo, M1-M6: Muestras de sangre analizadas positivas para *L. mexicana*.

10.3. Determinación de la prevalencia de parásitos del género *Leishmania* en animales de interés pecuario

A partir de las muestras analizadas mediante técnicas moleculares (PCR-RFLP) se obtuvo como resultado que 10 equinos, 4 bóvidos y 2 suidos son positivos a la infección por *L. mexicana*, lo que corresponde a una prevalencia del 41.66%, 44.4% y 50% respectivamente (Figura 15).

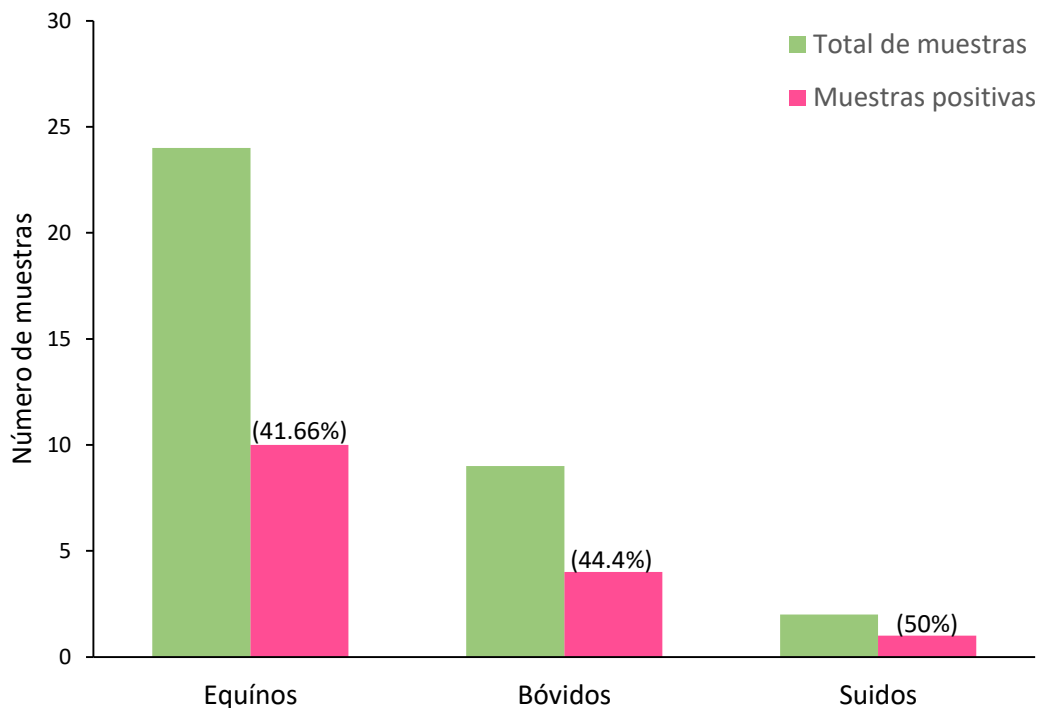


Figura 15. Muestras sanguíneas de animales de interés pecuario portadores de *L. mexicana*.

Se observa el número de muestras sanguíneas obtenidas de animales de interés pecuario. En paréntesis se muestra el porcentaje animales portadores de *L. mexicana*.

XI. ANALISIS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta investigación demuestran que los animales de interés pecuario funcionan como reservorios en el ciclo de vida de parásitos del género *Leishmania* en la entidad, lo que sugiere la existencia de un ciclo biológico establecido en el ámbito doméstico-rural en Sinaloa, esto dada la presencia del parásito en porcentajes elevados 41.66%, 44.4%, 50% de las muestras colectadas de equinos, bóvidos y suidos respectivamente, sin embargo, el tamaño de muestra en algunos grupos como los cerdos y bóvidos es bajo, lo cual es una limitante en la interpretación estadística en términos de asignar el grado de importancia de estos reservorios. Pese a lo anterior, el hecho de contar en la área de estudio con el registro de leishmaniasis canina autóctona (Castillo-Ureta et al., 2019), aunado a los resultados anteriormente descritos, pueden indicar que el sitio es hiperendémico para Leishmaniasis.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a lo publicado por Han y colaboradores quienes, en el año 2018 en China, analizaron muestras sanguíneas de 114 borregos, las cuales fueron sometidas a técnicas moleculares (PCR-RFLP) para detectar la presencia de parásitos *Leishmania* y la especie infectiva, obteniendo como resultado que el agente causal corresponde a *L. infantum* y con una tasa de incidencia del 54.39%; la cual al ser tan elevada, los autores consideran que los borregos asintomáticos contribuyen como hospederos a la transmisión de LV y además sugieren que son una potencial fuente de infección para la población humana en zonas endémicas de leishmaniasis (Han et al.,

2018). Lo mismo puede estar sucediendo en la localidad estudiada, por lo que se considera necesario el monitoreo permanente de ovinos en la región.

Por otra parte nuestros resultados mostraron una mayor prevalencia a lo reportado por Gao y colaboradores quienes en 2015 realizaron una investigación en una región de China donde previamente se reportó un brote por LV, en ese estudio trataban de vincular como posibles reservorios de *L. infantum* a especies silvestres y domésticas que habitaban en la zona a través de técnicas moleculares; entre las especies estudiadas se encontraban borregos y burros de los cuales se muestra una positividad de 30.36% y 21.56% respectivamente (Gao *et al.*, 2015).

Respecto a lo reportado en el continente Americano, aunque para especies de *Leishmania* distintas, la comparativa de resultados muestra una mayor prevalencia en el presente estudio que lo reportado en una región endémica de leishmaniasis en Brasil donde se analizaron muestras de equinos (caballos, burros y mulas) con la finalidad de conocer si estos animales pudieran formar parte del ciclo de vida del parásito *Leishmania*, los resultados obtenidos muestran un 16.6%, 18.5% y 10.5% de muestras positivas, respectivamente (Truppel *et al.*, 2014); por otro lado, también en Brasil en el año 2019, Escobar y colaboradores analizaron muestras en la población equina de una zona catalogada como endémica de leishmaniasis canina, donde los animales muestreados generalmente dormían en los patios de las viviendas a las cuales pertenecían; los resultados que obtuvieron mediante técnicas moleculares mostraron que 14.3% de las muestras colectadas presentaban infección por *L. infantum* (Escobar *et al.*, 2019); debido a esos resultados, los autores de estos estudios sugieren los equinos pudieran no

simplemente servir como fuente de alimentación del vector, sino para mantener el ciclo de vida de estos parásitos en ambientes peridomiciliares, lo cual muy probablemente sea un factor de riesgo similar e importante para los pobladores de la zona de estudio.

Los porcentajes de organismos positivos para *L. mexicana* en las especies muestreadas fue muy similar, esto puede relacionarse a que el o los vectores que presentes en el área de estudio no muestran afinidad hacia alguna especie en particular y se comportan como generalistas alimentándose de cualquier organismo, como lo demuestran Remadi y colaboradores en Egipto en 2020, quienes capturaron flebótomos con la finalidad de analizar sus fuentes de alimentación y obtuvieron como resultado que al menos tres especies de dípteros (*Ph. longicuspis*, *Ph. perfiliewi*, y *Ph. perniciosus*) participan en la transmisión de *L. infantum* en la zona y que las fuentes de alimentaron fueron bovinos (39.05%), humanos (24.85%), borregos (5.91%), pollos (4.73%), cabras (4.14%), burros (1,18%) y pavos (0,59%); y a demás reportan que tanto *L. infantum* como *L. mexicana* promueven la alimentación de múltiples hospederos (Remadi *et al.*, 2020); por lo tanto es factible sugerir que la especie infectante influye en que los vectores presentes en el área de estudios se comporten como generalistas.

Como puede observarse, las prevalencias reportadas en los trabajos de investigación realizados tanto en el Viejo como en el Nuevo mundo contrastan en su mayoría con lo reportado en este estudio, estas diferencias pueden relacionarse con la especie del agente causal y su capacidad infectiva debido a que según lo reportado por Peacock y colaboradores quienes en Brasil en el año

2007 realizaron comparaciones en el genoma de *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. major* y sugieren que aunque fueron pocas las diferencias encontradas entre las secuencias de ADN de las especies, se pueden relacionar con las distintas presentaciones de la enfermedad, respuesta inmunológica y patogenicidad (Peacock *et al.*, 2007); es por ello que podríamos sugerir que una de las variantes que se relaciona con la alta prevalencia observada en este estudio en contraste con lo reportado por otros investigadores alrededor del mundo sea que la variabilidad genética de *L. mexicana* es una ventaja para el parásito ya que podría favorecer su supervivencia en diversos ecosistemas así como su capacidad de infección e incluso la respuesta a los tratamientos.

XII. CONCLUSIONES

- En este estudio se logró determinar por primera vez en el estado de Sinaloa la presencia de parásitos del género *Leishmania* en sangre periférica de equinos, bóvidos y suidos.
- Se determinó que el agente causal responsable de la infección en animales de interés pecuario corresponde a *L. mexicana*.
- La prevalencia de la infección en los animales supera el 40%, lo cual podría implicar un riesgo latente para la población que habita el área de estudio.

XIII. PERSPECTIVAS

- Continuar con el monitoreo de animales de interés pecuario, así como de los posibles vectores presentes en el área de estudio, ya que el reconocer los elementos involucrados en el ciclo de vida del parásito, permitirá promover las medidas de mitigación y/o prevención de esta parasitosis tanto para las personas como para los animales.
- Ampliar el número de muestras y de especies a analizar con el fin de vincular las especies como posibles reservorios de *Leishmania*.
- Realizar análisis parasitológicos que permitan aislar el parásito de los reservorios y/o hospederos.
- Probar tratamientos en aquellos animales que resulten positivos y evaluar la evolución de la enfermedad y sus signos.

XIV. ANEXOS

14.1. Consentimiento Informado

Se me ha informado sobre el proyecto y por propia voluntad otorgo mi consentimiento para que el material biológico recolectado en la toma de muestra sea elemento de estudio, siempre y cuando se respete la confidencialidad sobre el origen de la muestra en caso de que los resultados de la investigación sean publicados en foros científicos o en medios impresos.

Fecha

Nombre y firma del propietario

Responsable técnico del laboratorio

Responsable del proyecto

Datos recabados por muestra:

Organismo muestreado	Edad	Raza	En corral de traspatio	Signos y/o lesiones	Observaciones

14.2. Siglas y Abreviaciones

1. CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
2. ETD: Enfermedades tropicales desatendidas
3. L. mex: Leishmania mexicana
4. LC: Leishmaniasis cutánea
5. LMC: Leishmaniasis mucocutánea
6. LV: Leishmaniasis visceral
7. OMS: Organización Mundial de la Salud
8. OPS: Organización Panamericana de la Salud

XV. REFERENCIAS

- Adeniran, A. A., Fernández-Santos, N. A., Rodríguez-Rojas, J. J., Treviño-Garza, N., Huerta-Jiménez, H., Mis-Ávila, P. C., Pérez-Pech, W. A., Hernández-Triana, L. M., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2019). Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis endemic areas in southeastern Mexico using DNA barcoding. *Ecology and Evolution*, *9*(23), 13543–13554. <https://doi.org/10.1002/ece3.5811>
- 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. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 10, Issue 3). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Allahverdiyev, A. M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., & Memisoglu, H. R. (2004). A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *70*(3), 294–297. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.294>
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., & Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Issue 2, pp. 334–359). <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & de

Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. In *PLoS ONE* (Vol. 7, Issue 5).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

Ampuero, J., Rios, A. P., Carranza-Tamayo, C. O., & Romero, G. A. S. (2009). Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: Applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(7), 992–997. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700009>

Andrade-Narvaez, F. J., Loría-Cervera, E. N., Sosa-Bibiano, E. I., & Van Wynsberghe, N. R. (2016). Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: Epidemiological and immunological studies. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(10), 599–604. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160138>

Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Ascencio, M. E., Sarmiento, N. F., Schnittger, L., Florin-Christensen, M., & Rodriguez, A. E. (2020). Molecular diagnosis of *Leishmania* spp. in dogs of a subtropical locality of Argentina. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(S2), 106–110. <https://doi.org/10.1111/tbed.13313>

Bañuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, *64*.

[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006).

Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(4), 1435–1439.

<https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>

Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-

Salazar, C., Stephens, C. R., Hidalgo-Mihart, M., Marina, C. F., Rebollar-

Téllez, E. A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C. D., Ibarra-Cerdeña, C. N.,

Sánchez-Cordero, V., & Becker, I. (2015). *Leishmania (L.) mexicana* Infected

Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Neglected Tropical*

Diseases, *9*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003438>

Boggild, A. K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Adai, V.,

Tulliano, G., Llanos-Cuentas, A., & Low, D. E. (2007). Evaluation of a

microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous

lesions of patients in Peru. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(11), 3680–

3684. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-07>

Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema

Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. (n.d.).

Retrieved June 19, 2021, from [https://www.gob.mx/salud/acciones-y-](https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico)

[programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico](https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico)

Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M. O., Blanco-Ciudad, J.,

Serrano, F. J., Pérez-Martín, J. E., Gómez-Gordo, L., Campino, L., Reina, D.,

& Frontera, E. (2016). Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources

in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: Update on distribution and risk factors associated. *Acta Tropica*, 164, 414–424.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.003>

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. In *The Lancet* (Vol. 392, Issue 10151, pp. 951–970). Lancet Publishing Group.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., & Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. In *Trends in Parasitology* (Vol. 31, Issue 3, pp. 100–108). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.012>

Castillo-Ureta, H., Zazueta-Moreno, J. M., Rendón-Maldonado, J. G., Torres-Avendaño, J. I., López-Moreno, H. S., Olimón-Andalón, V., Salomón-Soto, V. M., Pérez-Sánchez, F. P., & Torres-Montoya, E. H. (2019). First report of autochthonous canine leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) mexicana* in Sinaloa, Mexico. *Acta Tropica*, 190, 253–256.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.027>

Chakravarty, J., Hasker, E., Kansal, S., Singh, O. P., Malaviya, P., Singh, A. K., Chourasia, A., Singh, T., Sudarshan, M., Singh, A. P., Singh, B., Singh, R. P., Ostin, B., Fakiola, M., Picado, A., Menten, J., Blackwell, J. M., Wilson, M. E., Sacks, D., ... Sundar, S. (2018). Determinants for progression from asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A cohort study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007216>

- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 5, Issue 11, pp. 873–882). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Chen, H. M., Chen, H. Y., Tao, F., Gao, J. P., Li, K. L., Shi, H., Peng, H., & Ma, Y. J. (2020). Leishmania infection and blood sources analysis in *Phlebotomus chinensis* (Diptera: Psychodidae) along extension region of the loess plateau, China. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S40249-020-00746-8>
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In *Dermatologic Therapy* (Vol. 22, Issue 6, pp. 491–502). <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. In *American Journal of Clinical Dermatology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 99–109). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.* (n.d.). Retrieved July 5, 2021, from <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-desatendidas-tropicales-transmitidas-por-vectores>
- Escobar, T. A., Dowich, G., Dos Santos, T. P., Zuravski, L., Duarte, C. A., Lübeck, I., & Manfredini, V. (2019). Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area. *BMC*

- Veterinary Research*, 15(1), 381. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2108-1>
- Esteva, L., Vargas, C., & Vargas de León, C. (2017). The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. *Mathematical Biosciences*, 293, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.08.006>
- Fenwick, A. (2012). The global burden of neglected tropical diseases. *Public Health*, 126(3), 233–236. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2011.11.015>
- Gao, C. H., Wang, J. Y., Zhang, S., Yang, Y. T., & Wang, Y. (2015). Survey of wild and domestic mammals for infection with leishmania infantum following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132493>
- Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2018). Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 12, pp. 25–40). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>
- González, C., Rebollar-Téllez, E. A., Ibáñez-Bernal, S., Becker-Fauser, I., Martínez-Meyer, E., Townsend Peterson, A., & Sánchez-Cordero, V. (2011). Current knowledge of Leishmania vectors in Mexico: How geographic distributions of species relate to transmission areas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(5), 839–846. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0452>
- González, K., Diaz, R., Ferreira, A. F., García, V., Paz, H., Calzada, J. E., Ruíz, M., Laurenti, M., & Saldaña, A. (2018). Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by Leishmania Viannia panamensis in Panama.

Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 60.

<https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860008>

Goto, H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 69. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s24764>

Gurel, M. S., Tekin, B., & Uzun, S. (2020). Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clinics in Dermatology*, 38(2), 140–151.

<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.10.008>

Han, S., Wu, W. P., Chen, K., Osman, I., Kiyim, K., Zhao, J., Hou, Y. Y., Wang, Y., Wang, L. Y., & Zheng, C. J. (2018). Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *Leishmania* in China 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. In *BMC Veterinary Research* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1701-z>

Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y., & Schwartz, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. In *Journal of the American Academy of Dermatology* (Vol. 73, Issue 6, pp. 911–926). Mosby Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>

Ishemgulova, A., Kraeva, N., Hlaváčová, J., Zimmer, S. L., Butenko, A., Podešvová, L., Leštinová, T., Lukeš, J., Kostygov, A., Votýpka, J., Volf, P., & Yurchenko, V. (2017). A putative ATP/GTP binding protein affects *Leishmania mexicana* growth in insect vectors and vertebrate hosts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005782>

- Jorjani, O., Mirkarimi, K., Charkazi, A., Shahamat, Y. D., Mehrbakhsh, Z., & Bagheri, A. (2019). The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Golestan Province, Iran: A cross-sectional study of 8-years. *Parasite Epidemiology and Control*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00099>
- Kar, K. (1995). Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(2), 123–152. <https://doi.org/10.3109/10408419509113537>
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. In *Dermatologic Clinics* (Vol. 33, Issue 3, pp. 579–593). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Lemke, A., Kiderlen, A. F., & Kayser, O. (2005). Amphotericin B. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 68, Issue 2, pp. 151–162). <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>
- Limeira, C. H., Alves, C. J., Azevedo, S. S. de, Santos, C. de S. A. B., Melo, M. A. de, Soares, R. R., Barnabé, N. N. da C., & Rodrigues, G. de Q. (2019). Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: a systematic review and meta-analysis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(4), 574–581. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019074>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.04.003>
- Lozano-Sardaneta, Y. N., Paternina, L. E., Sánchez-Montes, S., Quintero, A., Ibáñez-Bernal, S., Sánchez-Cordero, V., Bejarano, E. E., & Becker, I. (2020). DNA barcoding and fauna of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Acta Tropica*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105220>
- Lyra, M. R., da Silva, A. B., Valete-Rosalino, C. M., & Pimentel, M. I. F. (2020). Clinical and epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis with genital involvement. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 95(5), 641–644. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.12.010>
- Machado, G. U., Prates, F. V., & Machado, P. R. L. (2019). Disseminated leishmaniasis: Clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94(1), 9–16. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198775>
- Maia, C., & Campino, L. (2018). Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302>
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine

- leishmaniasis in Latin America. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 123, pp. 261–272). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM*, *107*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Mehrizi, T. Z., Khamesipour, A., Ardestani, M. S., Shahmabadi, H. E., Hoseini, M. H. M., Mosaffa, N., & Ramezani, A. (2019). Comparative analysis between four model nanoformulations of amphotericin b-chitosan, amphotericin b-dendrimer, betulinic acid-chitosan and betulinic acid-dendrimer for treatment of leishmania major: Real-time pcr assay plus. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 7593–7607. <https://doi.org/10.2147/IJN.S220410>
- Mokni, M. (2019). Cutaneous leishmaniasis. In *Annales de Dermatologie et de Venereologie* (Vol. 146, Issue 3, pp. 232–246). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
- Molyneux, D. H., Savioli, L., & Engels, D. (2017). Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. In *The Lancet* (Vol. 389, Issue 10066, pp. 312–325). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4)
- Mukhtar, M. M., Sharief, A. H., El Saffi, S. H., Harith, A. E., Higazzi, T. B., Adam, A. M., & Sulieman Abdalla, H. (2000). Detection of antibodies to Leishmania donovani in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: A preliminary report. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *94*(1), 33–36. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90429-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90429-2)

Muñoz-García, C. I., Sánchez-Montes, S., Villanueva-García, C., Romero-Callejas, E., Díaz-López, H. M., Gordillo-Chávez, E. J., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., & Rendón-Franco, E. (2019). The role of sloths and anteaters as *Leishmania* spp. reservoirs: a review and a newly described natural infection of *Leishmania mexicana* in the northern anteater. In *Parasitology Research* (Vol. 118, Issue 4, pp. 1095–1101). Springer Verlag.

<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06253-6>

Navin, T. R., Arana, B. A., Arana, F. E., Berman, J. D., & Chajón, J. F. (1992). Placebo-Controlled Clinical Trial of Sodium Stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *Journal of Infectious Diseases*, 165(3), 528–534.

<https://doi.org/10.1093/infdis/165.3.528>

Ochoa-Diaz, Y. O., Lopez-Moreno, C. Y., Rendon-Maldonado, J. G., & Lopez-Moreno, H. S. (2012). Molecular diagnosis of *leishmania mexicana* in a cutaneous leishmaniasis case in sinaloa, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 78–80. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0688>

OPS/OMS | *Leishmaniasis en las Américas*. (n.d.). Retrieved June 27, 2021, from https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9470:leishmaniasis-factsheet&Itemid=40721&lang=es

Osorio, R. A. (2015). "*Diversidad de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en localidades de la Región*."

Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69(S1), S10–S18.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., ... Berriman, M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, 39(7), 839–847. <https://doi.org/10.1038/ng2053>

Pereira, A., & Perez, M. (2002). *Leishmaniosis*. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13038008>

Ramirez, J. R., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J. F., Berberich, C., Barker, D., & Velez, I. D. (2000). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: The sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3768–3773. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3768-3773.2000>

Remadi, L., Chargui, N., Jiménez, M., Molina, R., Haouas, N., González, E., Chaabane-Banaouas, R., Ben Salah, E., Haddaji, M., Chaabouni, Y., & Babba, H. (2020). Molecular detection and identification of leishmania dna and blood meal analysis in phlebotomus (Larroussius) species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008077>

Ríos-Tostado, J. J., Castillo-Ureta, H., Torres-Montoya, E. H., Torres-Avendaño, J. I., Olimón-Andalón, V., Romero-Higareda, C. E., Silva-Hidalgo, G., & Zazueta-Moreno, J. M. (2021). Molecular Detection of *Leishmania* (L.) mexicana (Kinetoplastida: Trypanostomatidae) DNA in *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae) from an Area with Autochthonous Canine Leishmaniasis in

Northwestern Mexico. *Acta Parasitologica*, 1, 3.

<https://doi.org/10.1007/s11686-021-00335-1>

Ríos JM, Y. de R. E. (2010). Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea. *Revista Médico Científica*, 23(2), 45–60.

http://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/260/pdf_

13

Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. In *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* (Vol. 3, Issue 3, pp. 251–262). Australian Society for Parasitology. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>

Sanchez-Moreno, E. C. J. F. G.-C. E. T.-G. (2015). *Leishmaniasis cutánea. Evolución natural de un caso y su tratamiento*. 160–161.

<https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2015/dcm152n.pdf>

Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), 588–596.

<https://doi.org/10.3855/jidc.6833>

Schubach, A., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A. V., Sartori, A., De Oliveira-Neto, M. P., Mattos, M. S., Araújo, M. L., Souza, W. J. S., Haddad, F., Perez, M. D. A., Pacheco, R. S., Momen, H., Coutinho, S. G., De Almeida Marzochi, M. C., Marzochi, K. B. F., & Gonçalves Da Costa, S. C. (2001). Leishmanial Antigens in the Diagnosis of Active Lesions and Ancient Scars of American Tegumentary Leishmaniasis Patients. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*,

96(7), 987–996. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000700018>

Shokri, A., Abastabar, M., Keighobadi, M., Emami, S., Fakhar, M., Teshnizi, S. H., Makimura, K., Rezaei-Matehkolaei, A., & Mirzaei, H. (2018). Promising antileishmanial activity of novel imidazole antifungal drug luliconazole against *Leishmania major*: In vitro and in silico studies. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.007>

Solano-Gallego, L., Mirá, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

Sundar, S., & Chakravarty, J. (2008). Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(5), 787–794. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.5.787>

Taslimi, Y., Zahedifard, F., & Rafati, S. (2018). Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145(4), 497–507. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>

Toghueo, R. M. K. (2019). Anti-leishmanial and Anti-inflammatory Agents from Endophytes: A Review. In *Natural Products and Bioprospecting* (Vol. 9, Issue 5, pp. 311–328). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-00220-5>

Tolezano, J. E., Uliana, S. R. B., Taniguchi, H. H., Araújo, M. F. L., Barbosa, J. A. R., Barbosa, J. E. R., Floeter-Winter, L. M., & Shaw, J. J. (2007). The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*)

diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 149(3–4), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>

Truppel, J. H., Otomura, F., Teodoro, U., Massafera, R., Da Costa-Ribeiro, M. C. V., Catarino, C. M., Dalagrana, L., Ferreira, M. E. M. C., & Thomaz-Soccol, V. (2014). Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093731>

van Griensven, J., & Diro, E. (2012). Visceral Leishmaniasis. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 26, Issue 2, pp. 309–322). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>

Varikuti, S., Jha, B. K., Volpedo, G., Ryan, N. M., Halsey, G., Hamza, O. M., McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2018). Host-directed drug therapies for neglected tropical diseases caused by protozoan parasites. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02655>

Vincent, I. M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T. K., & Ouellette, M. (2014). Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.11.002>

Von Stebut, E. (2007). Cutaneous *Leishmania* infection: Progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental Dermatology*, 16(4), 340–346. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00554.x>

Von Stebut, E. (2015). Leishmaniasis. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 13(3), 191–200. <https://doi.org/10.1111/ddg.12595>

Watts, C. (2017). Neglected tropical diseases: A DFID perspective. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005492>

Zamora-Ledesma, S., Hernández-Camacho, N., Sánchez-Moreno, M., Ruiz-Piña, H., Villagrán-Herrera, M. E., Marín-Sánchez, C., Carrillo-Angeles, I. G., Jones, R. W., & Camacho-Macías, B. (2020). Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in dogs from a metropolitan region of Central Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 22.
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100459>