



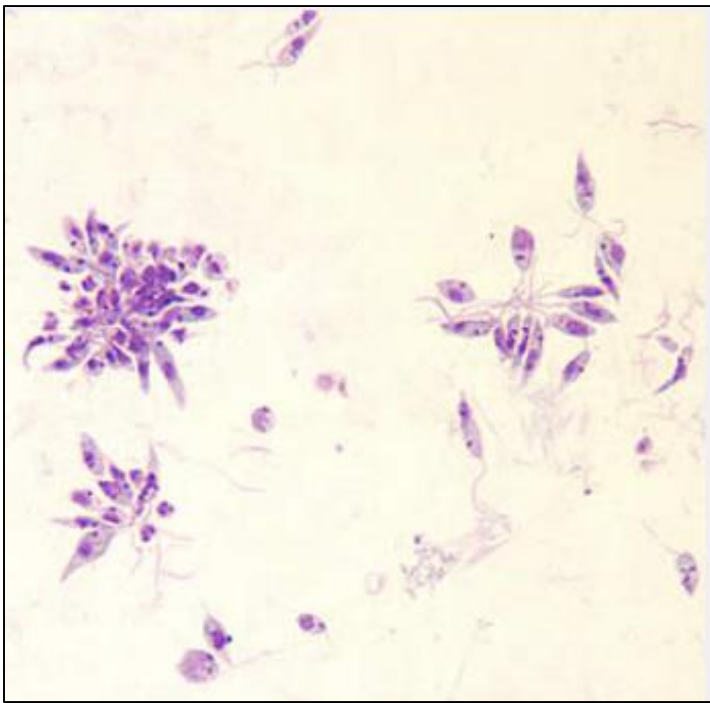
# Universidad Internacional Sek

## Trabajo de Fin de Carrera :

**“Evaluación de las histonas de *Leishmania mexicana* como antígenos para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis en equinos ”**

**Naraly Arianna Ramos Figueroa**

# Leishmaniasis



Fuente : (CDC,2015)

- Parásito protozoario  
**familia** Trypanosomatidae  
**género** *Leishmania*
- Se ha identificado 30 especies de las cuales 20 son patógenas para seres humanos .
- Es endémica en zonas tropicales y subtropicales

**Transmitida**



Fuente :(Gálvez Esteban , 2011)

- Vectores  
Biológicos  
**Géneros :**  
*Phlebotomus*  
*Lutzomyia*

# Formas Clínicas

## Leishmaniasis cutánea

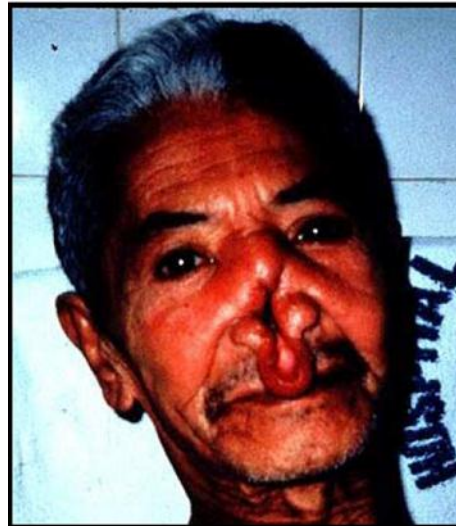
*L. braziliensis*, *L. panamensis*,  
*L. guyanensis* y *L. peruviana*



Fuente : (OMS, 2010)

## Leishmaniasis Mucosa

*L. mexicana*, *L. amazonensis*  
*L. braziliensis* y *L. panamensis*



Fuente : (OMS)

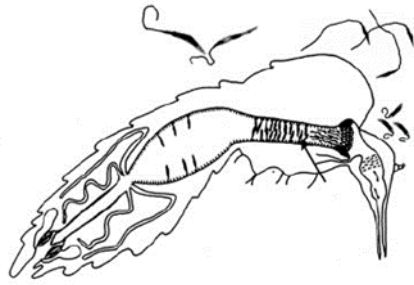
## Leishmaniasis Visceral

*L. donovani* y  
*L. infantum*

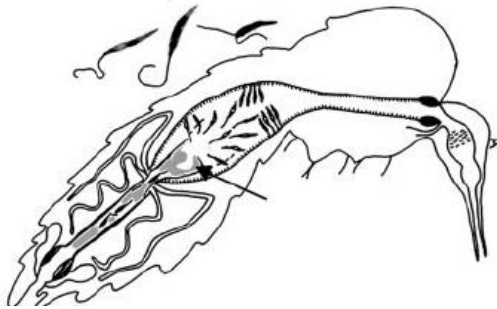


Fuente : (OMS)

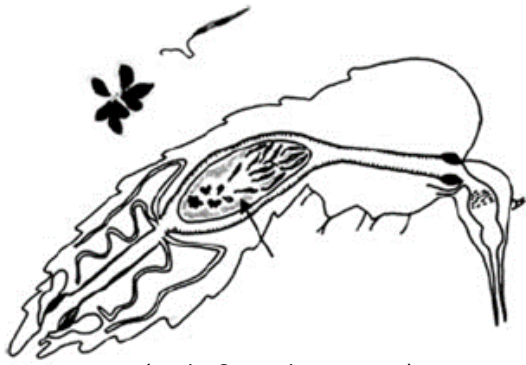
# Ciclo de vida del parásito



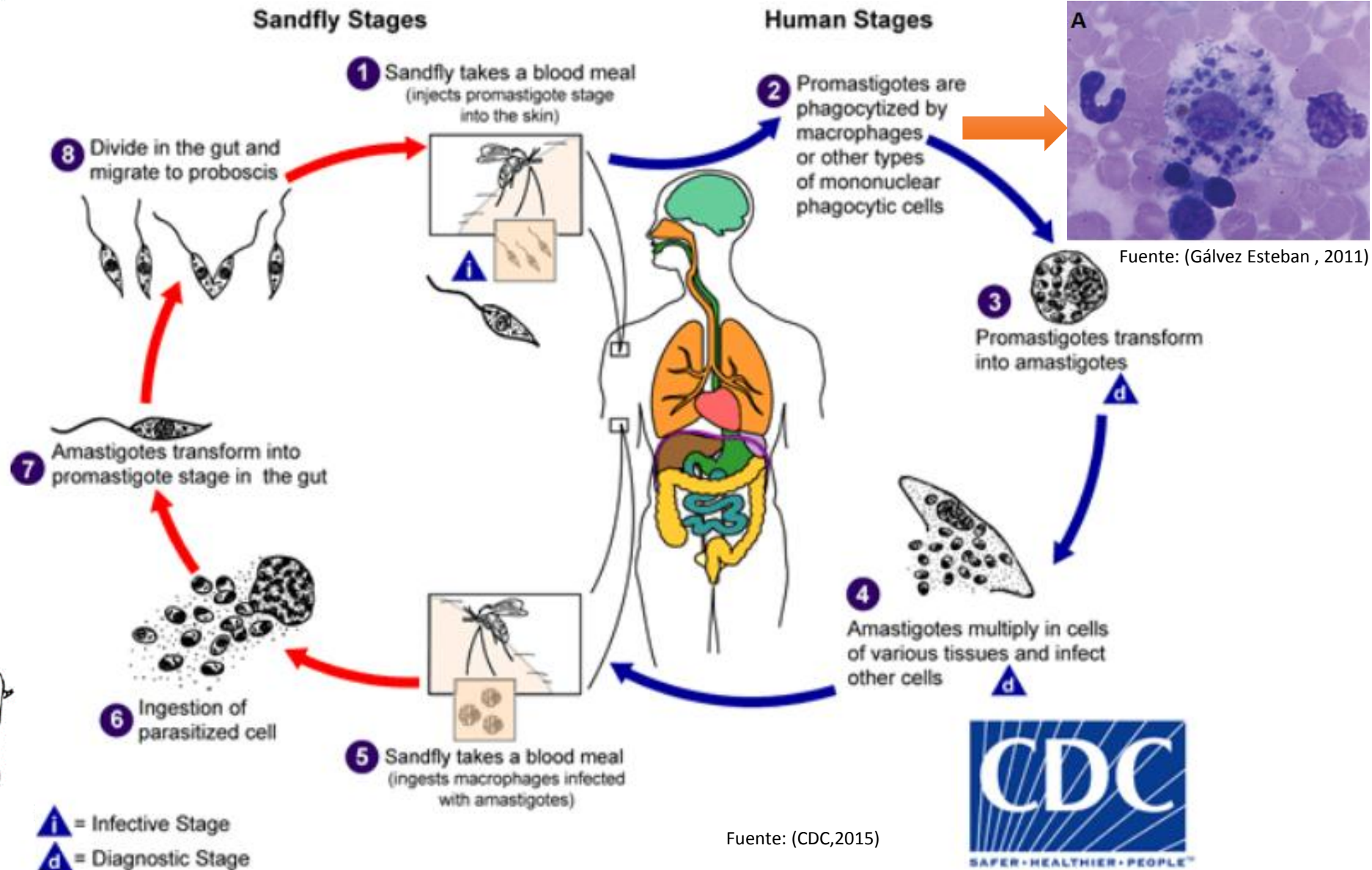
Fuente : (Sacks & Kamhawi ,2001)



Fuente : (Sacks & Kamhawi ,2001)

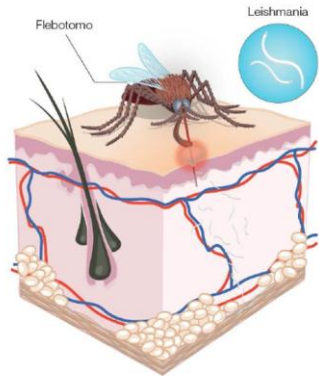


Fuente : (Sacks & Kamhawi ,2001)



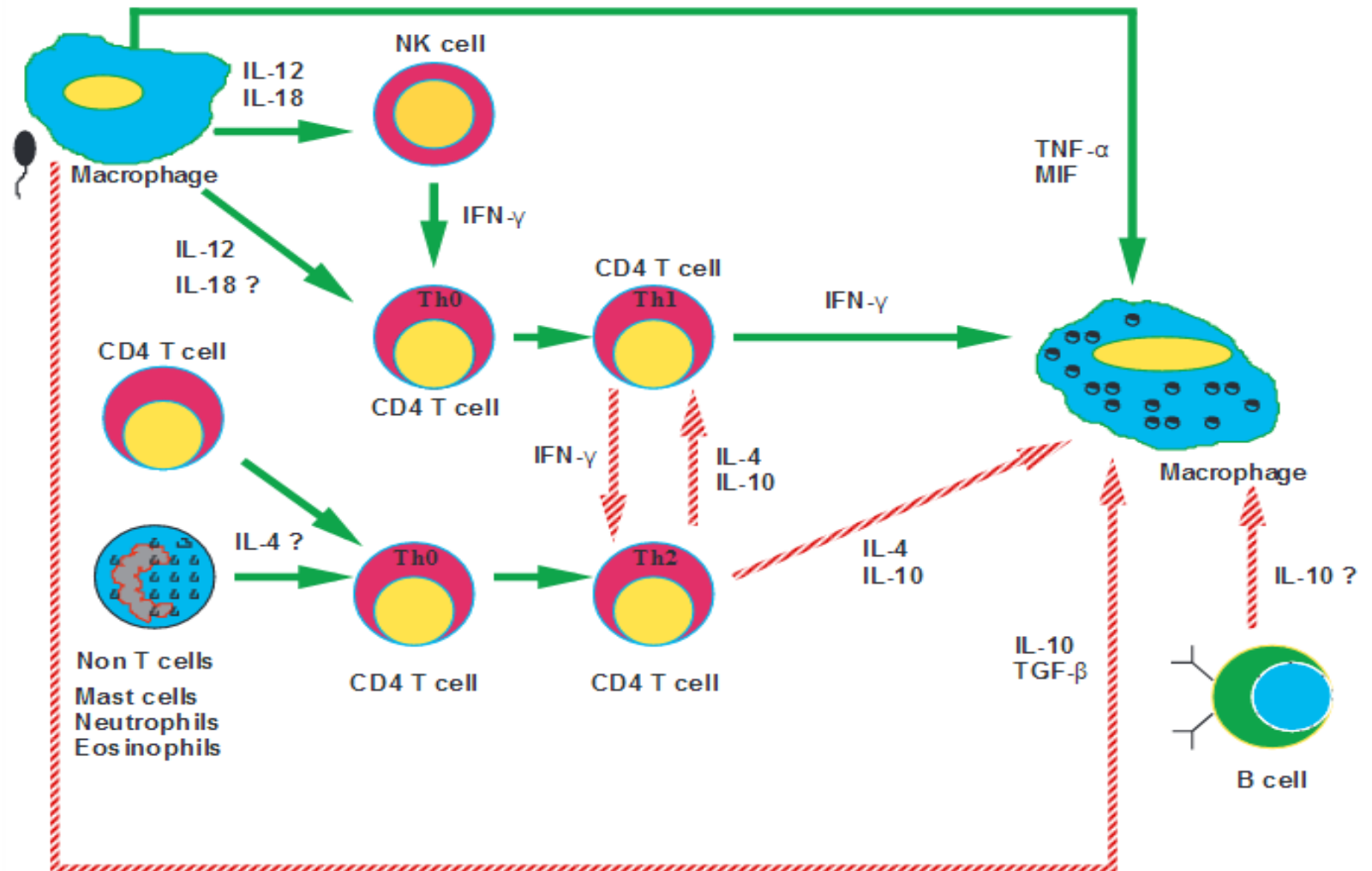


# Respuesta inmunitaria



Fuente: <http://miradaprofesional.com/ampliarpagina.php?id=3814&npag=2>

Los parásitos de *Leishmania*, son patógenos intracelulares obligados, es decir invaden células para poder replicarse, por esta razón invaden preferentemente macrófagos y células dendríticas.

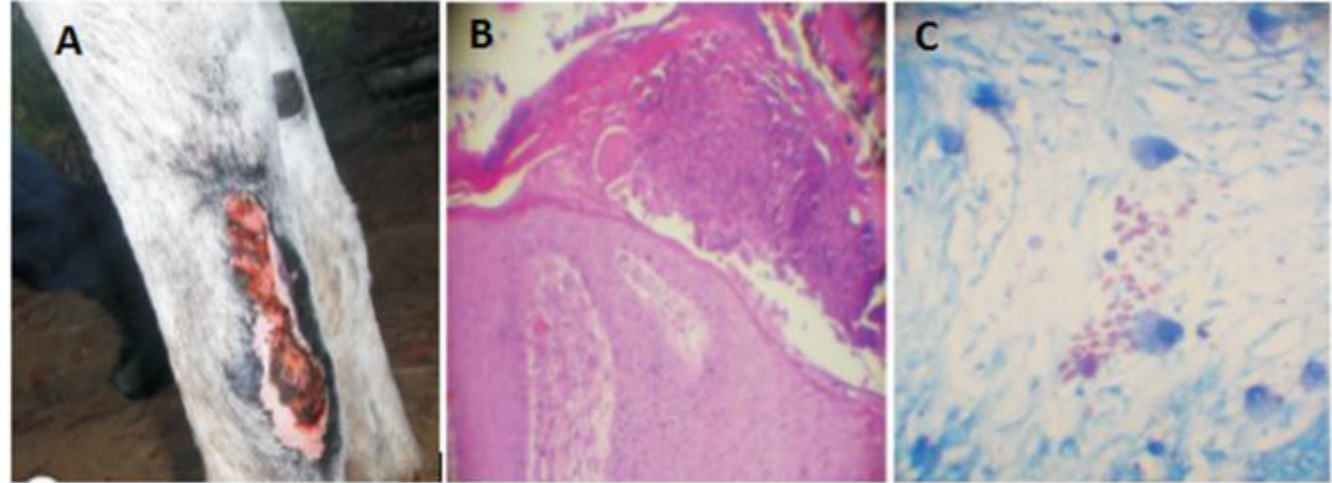
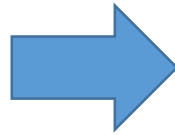


Fuente: (Alexander, Satoskar, & Russell, 1999).

# Leishmaniasis en equinos



Fuente: ( ICA,2010)



*Equus asinus* infectado con leishmaniasis A) Dermatitis nodular eritematosa, B) Cortes histológicos de piel, C) Cortes histológicos con coloración PAS

Fuente: (Morales B, et al., 2010)

- ✓ En los últimos años se han reportado infecciones de equinos en Venezuela, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos .
- ✓ Sin embargo, no se conoce con exactitud si estos animales son huéspedes reservorios de *Leishmania* o son huéspedes accidentales.

# Inmunogenicidad de las histonas



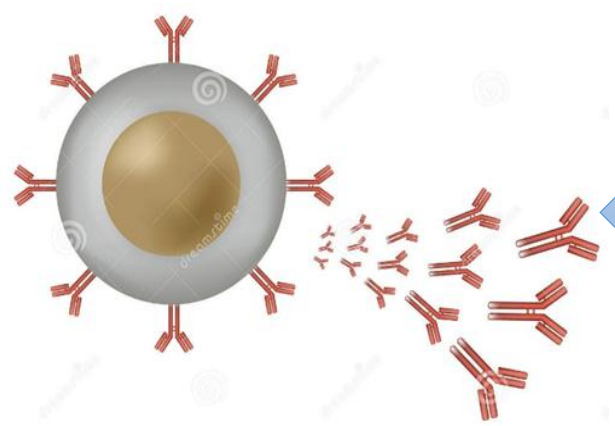
Fuente: <http://mascotafiel.com/leishmaniosis-en-perros/>



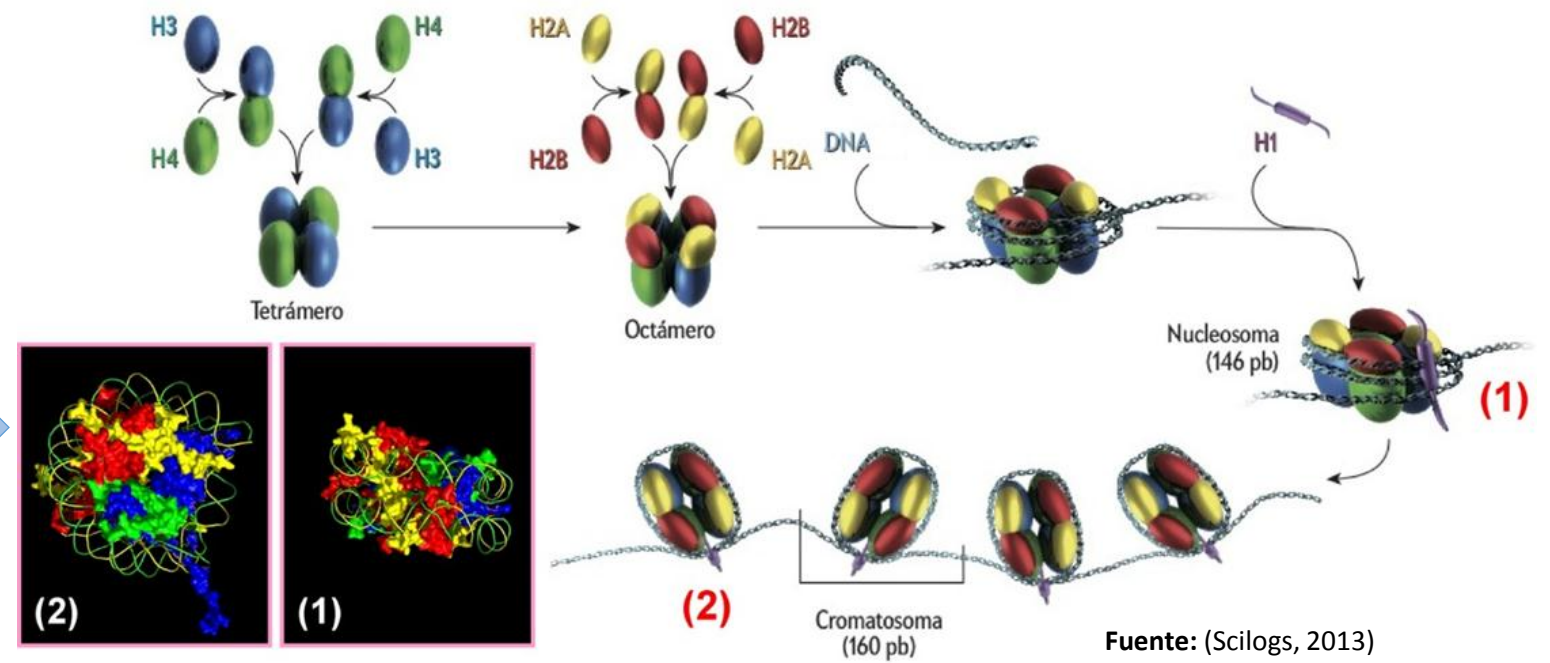
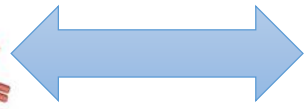
Fuente: ( CEU,2014)

De acuerdo con diferentes investigaciones los perros infectados con *Leishmania* están generando anticuerpos anti-histonas.

## HISTONAS



Fuente : (Dreamstime,2016)



Fuente: (Scilogs, 2013)

# Objetivos

## Objetivo general

- ✓ Evaluar las histonas de *Leishmania mexicana* como antígenos para el diagnóstico serológico de la Leishmaniasis en equinos.

## Objetivo específico

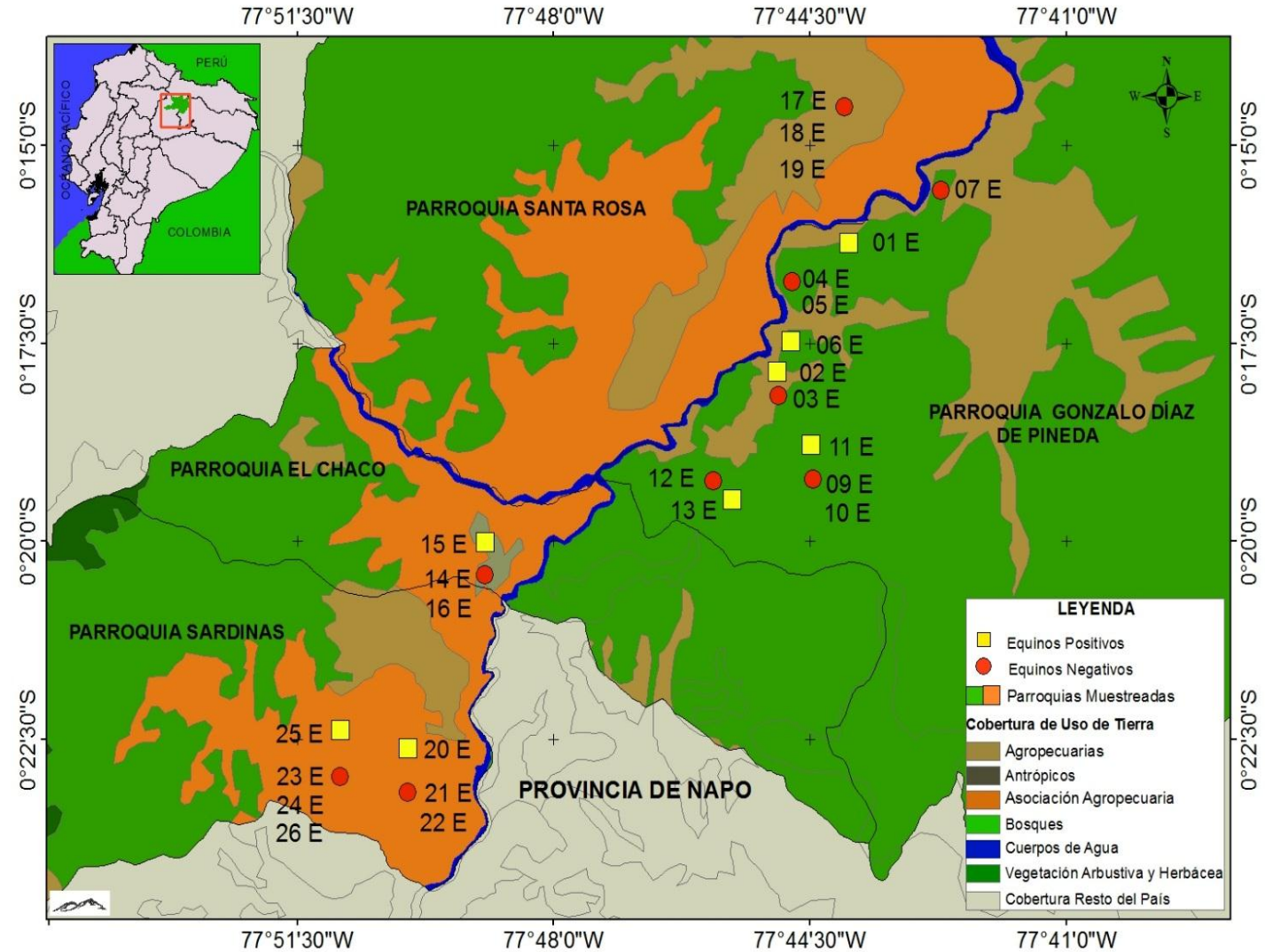
- ✓ Realizar el cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana* .
- ✓ Realizar el aislamiento de histonas de *Leishmania mexicana* .
- ✓ Determinar mediante western blot si las histonas de *Leishmania mexicana* son reconocidas por los anticuerpos de equinos infectados con *Leishmania amazonensis*.



# Metodología

# Área de estudio

- Las muestras fueron tomadas por el Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador (CIZ). En el límite de la provincia del Napo, entre las parroquias Gonzalo Díaz de Pineda, Santa Rosa de Quijos y Sardinas.
- Los sueros de los equinos fueron sometidos a técnicas parasitológicas y moleculares, se encontró que la especie infectante fue *Leishmania amazonensis* (comunicación personal Graciela Uzcanga).



Fuente: (Enriquez, 2016)

---

## Crecimiento del parásito

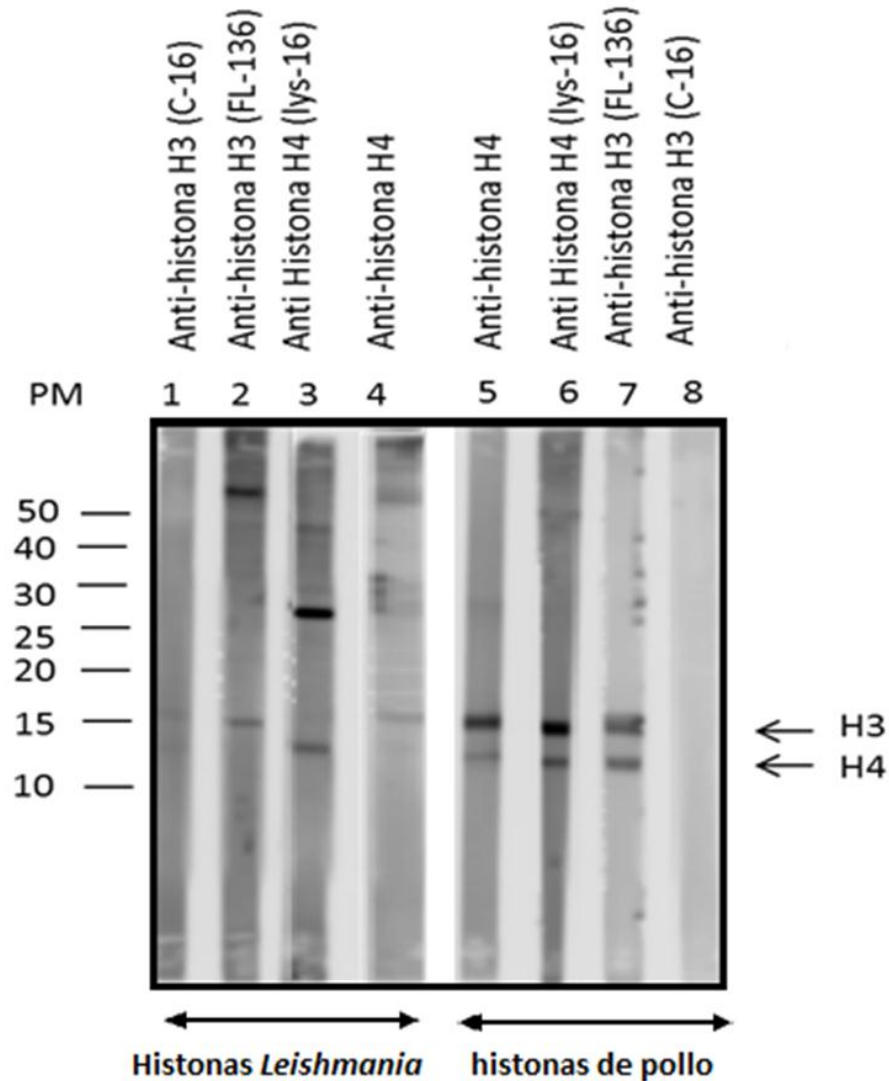
Promastigotes de *L. mexicana* MHOM / BZ / 82 / BEL21 se cultivaron en medio Schneider suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10%.

---



\*cepa de *Leishmania mexicana* donada por el Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador (CIZ)

# Identificación de las histonas de *Leishmania*



Fuente: (comunicación personal Graciela Uzcanga)



# Aislamiento de histonas de *Leishmania mexicana*

Ruptura hipotónica de los parásitos



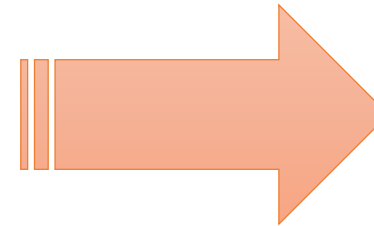
Horas  
centrifugación

Extracción ácida de las Histonas

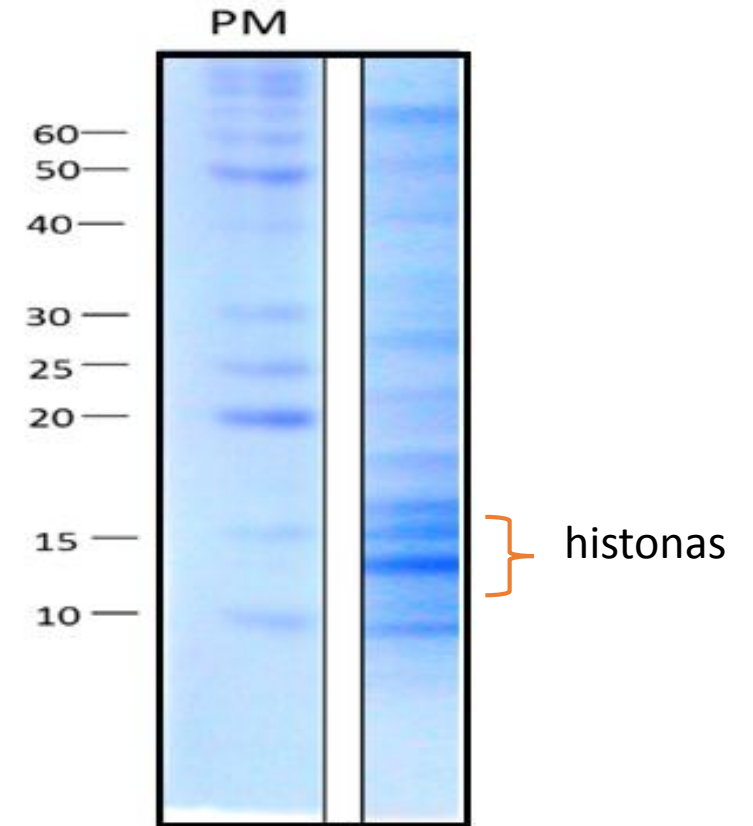


Precipitación con acetona

Cuantificación de proteínas (método de Qubit) obteniéndose una concentración de 115 µg/ml.



Electroforesis en el gel poliacrilamida 15%

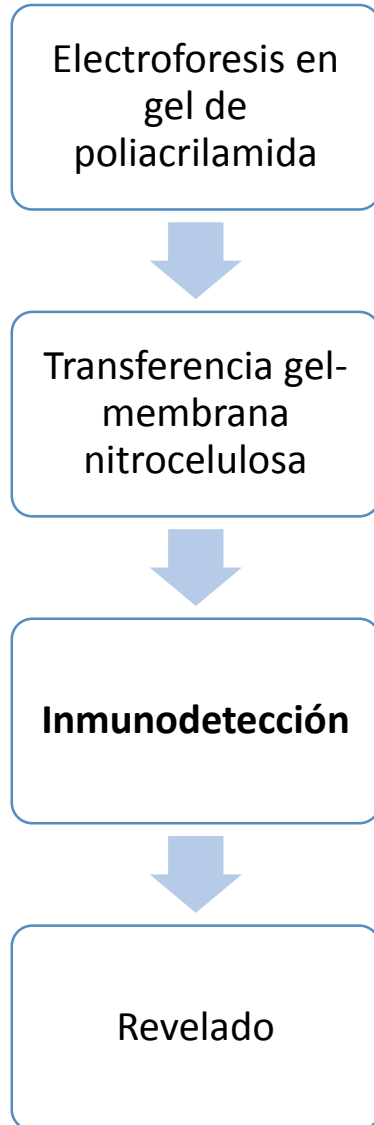


Fuente: (Ramos,2016)



Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

# Western Blot

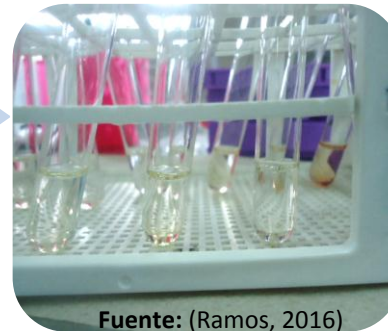


## Procedimiento para la inmunodetección



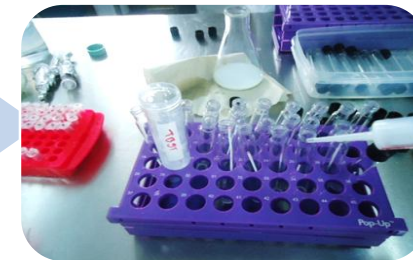
Fuente: (Ramos, 2016)

- Bloqueo de membrana (TBST 5% Leche descremada)



Fuente: (Ramos, 2016)

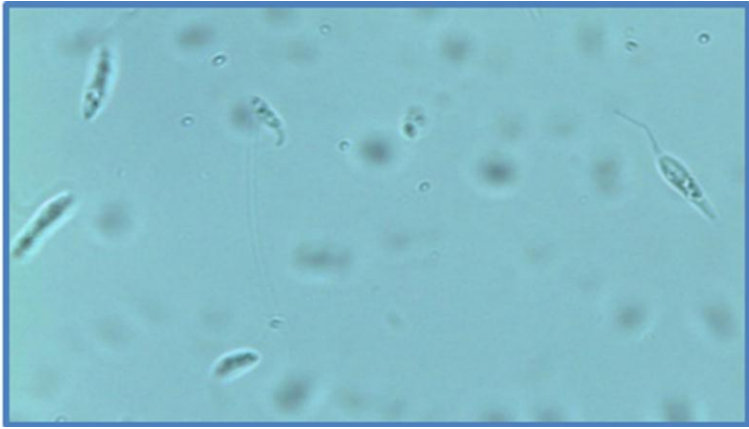
- Dilución de Sueros de equinos (1:100)



Fuente: (Ramos, 2016)

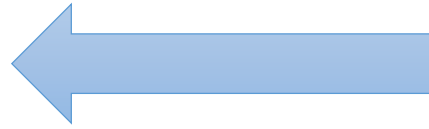
- Solución conjugante, (proteína A-peroxidasa )

# Resultados



Fuente: (Uzcanga,2016)

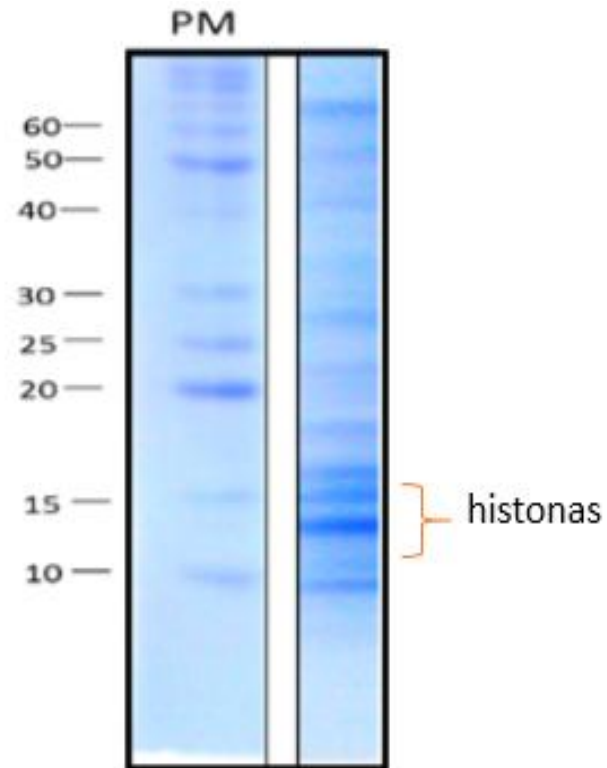
Crecimiento de los promastigotes de *Leishmania mexicana*



Aislamiento de histonas del parásito

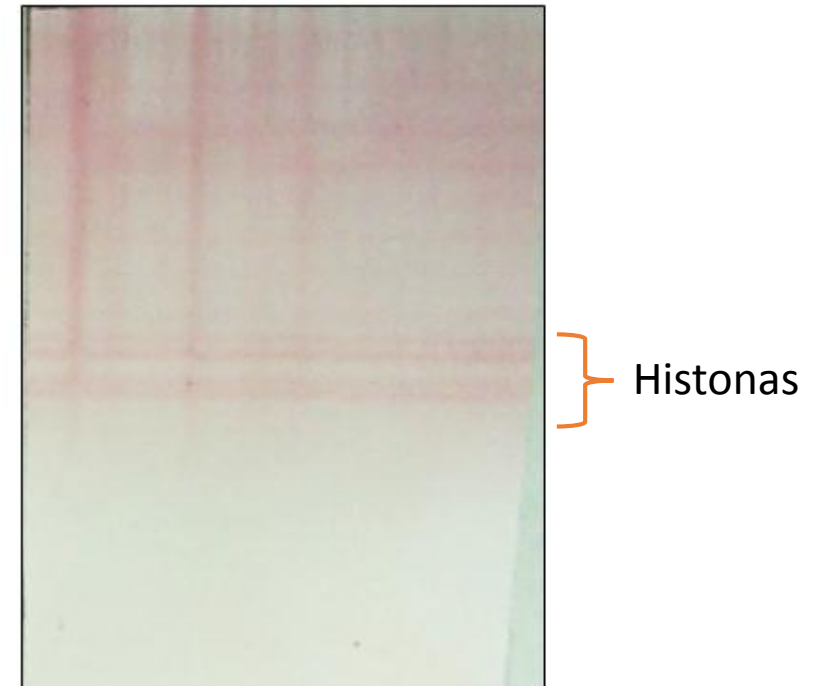


Gel de poliacrilamida al 15%



Fuente: (Ramos, 2016)

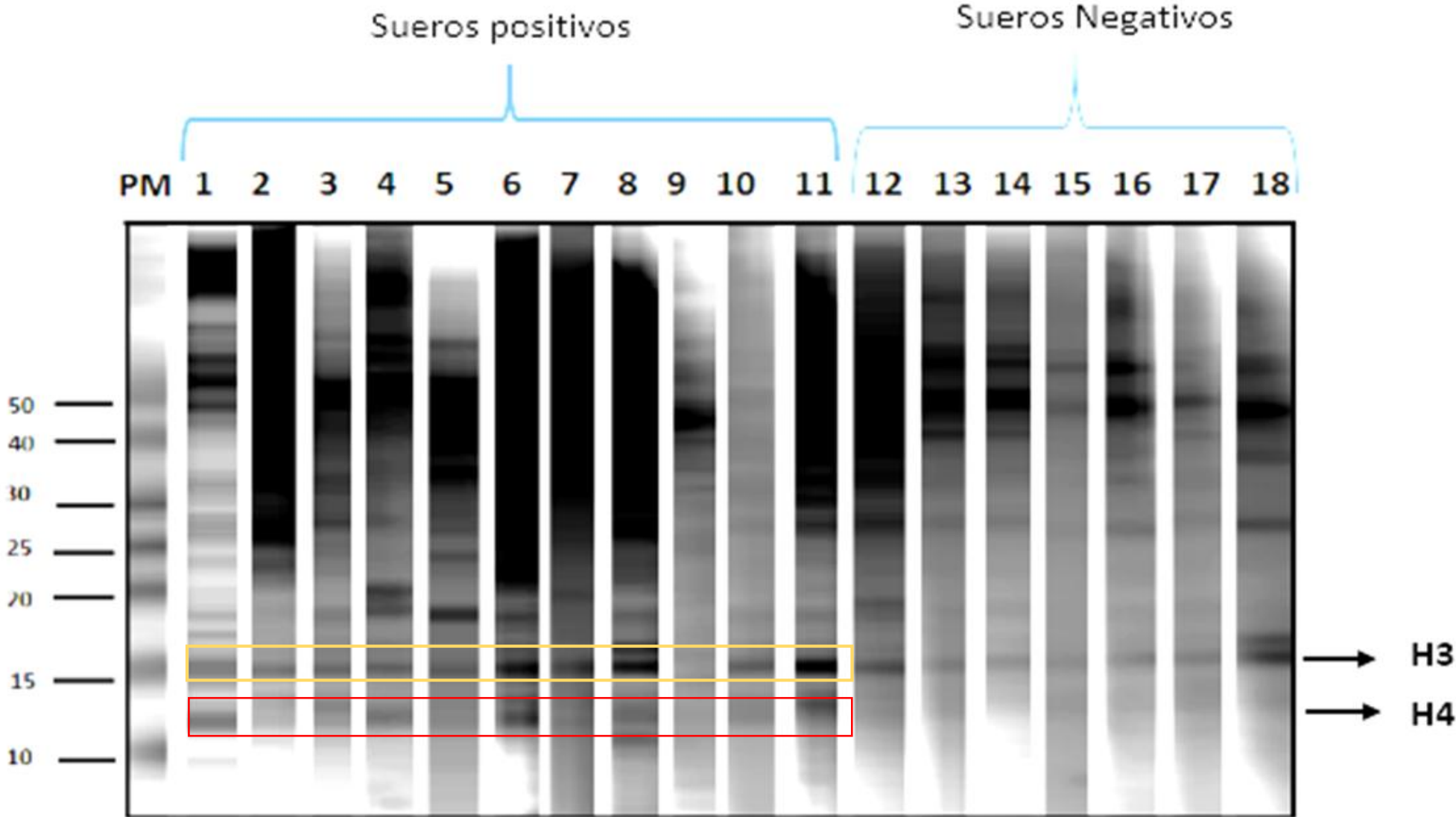
Transferencia de Proteínas (Histonas) teñidas con Rojo de Ponceau.



Fuente: (Ramos, 2016)



# Western blot



Fuente: (Ramos, 2016)

# Conclusiones

- Los promastigotes de *Leishmania mexicana* pueden ser cultivados *in vitro* en medio Schneider suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10%.
- El método de extracción ácida es apto para el aislamiento de las histonas de *Leishmania mexicana*.
- Los equinos infectados con *Leishmania amazonensis* generan anticuerpos anti histonas de *Leishmania*.
- Las histonas de *Leishmania* pueden ser utilizadas para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis en equinos.

# Recomendaciones

- Se recomienda mantener condiciones de asepsia en el laboratorio y trabajar en la cámara de flujo laminar, especialmente al momento de realizar el cultivo del parásito, debido a que el medio de cultivo es muy susceptible a la contaminación con otros microorganismos.
- También se recomienda mejorar la metodología empleada en el aislamiento de histonas, si bien, se logra el aislamiento de estas, se puede encontrar una gran cantidad de proteínas de altos pesos moleculares en el gel del poliacrilamida.
- Para futuros estudios de leishmaniasis en equinos se recomienda elevar el tamaño de muestras, y estudiar cual es la función de los equinos dentro del ciclo de vida del parásito.
- Con respecto al estudio de las histonas nucleosomales como posibles proteínas utilizadas para el desarrollo de diagnósticos serológicos en equinos, se recomienda estudiar el reconocimiento que tienen los sueros de equinos para las histonas H2A, H2B y H1, pues tal vez exista un reconocimiento más específico hacia cualquiera de estas histonas y se podría mejorar el desarrollo de métodos diagnósticos en equinos.
- También se recomienda estudiar cuales son los equinos más propensos a infectarse con el parásito *Leishmania*, pues no se ha logrado determinar si los caballos, burros o mulas, presentan fenotipos que los hace más susceptibles unos de otros.



Gracias por su  
atención.