



**Identificación y asociación de polimorfismos de
Toll-Like Receptor 3 con el desarrollo de
Leishmaniasis mucosa frente a la coinfección
Leishmania spp. – *Leishmania* RNA Virus 1**

Carolina María Vargas León

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de medicina, Departamento de microbiología, Maestría en inmunología
Bogotá, Colombia
2021

**Identificación y asociación de polimorfismos de Toll-Like Receptor 3 con el desarrollo de Leishmaniasis mucosa frente a la coinfección *Leishmania* spp. –
Leishmania RNA Virus 1**

Carolina María Vargas León

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Magister en Inmunología

Directora:

María Clara Echeverry Gaitán MD, PhD

Codirector:

Luis Fernando Cadavid Gutiérrez MD, PhD

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Departamento de microbiología, Maestría en inmunología

Bogotá, Colombia

2021

*A mi familia, mis amigos y a mi equipo FF
por su apoyo incondicional
y su compañía*

*Science is constructed out of approximations that gradually approach the
truth, you told me a long time back, and I've never forgotten it*
Isaac Asimov y Robert Silverberg, Nightfall.

DECLARACIÓN DE OBRA ORIGINAL

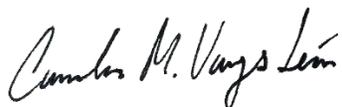
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Carolina María Vargas León

Fecha: 29 de septiembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

A los profesores María Clara Echeverry Gaitán MD, PhD y Luis Fernando Cadavid Gutiérrez MD, PhD, por la dirección de este trabajo, sus múltiples enseñanzas, por su apoyo y acompañamiento en este proceso.

Marcela Parra Muñoz B.Sc, M.Sc, a Fredy Alexander Pazmiño MD, M.Sc y a Samanta Aponte Briceño B.Sc, M.Sc por todo su apoyo y asesoría a lo largo de este trabajo.

Alejandro Contreras y Catherine Aguilar B.Sc, por su ayuda constante en el laboratorio.

Juan José Rubio Mesa B.Sc, por su asesoría estadística.

Paola González Camacho B.Sc, M.Sc, Nathaly Poveda B.Sc, y David Ballesteros Gómez B.Sc, por su por su compañía, su amistad, su ayuda y sus críticas constructivas que ayudaron a forjar este proyecto.

A mis padres, María León y Alberto Vargas Rodríguez M.A, PhD, porque sin ellos esto simplemente no habrá sido posible. A mi padre gracias por su asesoría durante la elaboración del documento escrito.

A mi familia: mis tíos, primos y abuelas, así como a mis amigos: Niyireth Suarez, Jeimy Hernández B.Sc, Tatiana Prieto, María Sandoval, Ernesto Botero, Yury Romero y Fabián Rodríguez MD por su acompañamiento y apoyo emocional sumamente importante para el desarrollo del proyecto.

A las instituciones:

Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, en donde se ejecutó este estudio y de cuyo biobanco provinieron las muestras clínicas

Hospital Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta por proveer las muestras de pacientes con Leishmaniasis y sus respectivas historias clínicas aquí analizadas.

Laboratorio de equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá en donde se ejecutó la mayor parte del estudio

Finalmente, a la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, un gran agradecimiento por formarme y ser mi hogar a lo largo de 21 años.

FINANCIACIÓN

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación, previamente llamado Colciencias, mediante el proyecto titulado: "Determinación de la asociación entre la presencia de Leishmaniavirus 1 (LRV-1) y el desarrollo de leishmaniasis mucosa en Colombia", código de proyecto: 110177758491. Adicionalmente se contó con el apoyo económico de la Maestría en inmunología del departamento de microbiología, facultad de medicina, de la universidad Nacional de Colombia.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad de transmisión vectorial producida por parásitos del género *Leishmania*. Esta enfermedad presenta tres manifestaciones clínicas: Leishmaniasis cutánea (LC), Leishmaniasis mucosa (LM) y Leishmaniasis visceral. LC se caracteriza por la aparición de pápulas y úlceras en la piel, mientras LM está dada por la aparición de úlceras en la cavidad oral o nasofaríngea; LM suele estar antecedida por LC, por lo que algunos autores consideran la LM como una progresión o complicación de la enfermedad. Si bien las razones por las cuales se produce LM aún no son del todo claras, se ha evidenciado que la presencia de Leishmania RNA Virus 1 (LRV1) en la cepa infectante de *Leishmania* se asocia con el desarrollo de LM, se ha planteado que el reconocimiento de LRV1 por el receptor de reconocimiento de patrones (PRR) endosomal Toll-like receptor 3 (TLR3) induce la activación de una respuesta inmune antiviral que favorece la persistencia y diseminación del parásito en el hospedero. El gen que codifica para TLR3 presenta varios polimorfismos de único nucleótido (SNPs) que se han visto asociados a resistencia o susceptibilidad frente a diversas infecciones virales. La presente investigación evaluó si los SNPs de TLR3 en población colombiana se asocian con el desarrollo de LM, ya sea en contexto de infección simple por *Leishmania* spp. o en coinfección *Leishmania* spp. – LRV1. Se efectuó un estudio retrospectivo de casos y controles, en donde se genotipificaron los exones 2, 3 y 4 del gen TLR3. Se analizó la presencia de polimorfismos en este grupo de exones en una población colombiana compuesta por 60 controles (muestras de pacientes diagnosticados con LC y sin complicación mucosa) y 27 casos (muestras de pacientes diagnosticados con LM) y mediante comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas en cada grupo se evaluó la potencial asociación entre los SNPs y el desenlace clínico de la enfermedad. Adicionalmente, se evaluaron otras variables que pudiesen asociarse con el desarrollo de LM como lo son: sexo, edad, tratamiento, entre otras, y se evaluó la estructura génica de TLR3 en la población colombiana; para esta última, se contrastó con la estructura génica de otras poblaciones a nivel mundial como población europea, asiática y africana, además de analizar su comportamiento en un contexto local, al contrastar los resultados obtenidos con población latinoamericana. Se observaron cuatro polimorfismos en la muestra de estudio, un SNP en el exón 2 del gen, en la región codificante para 5'UTR (rs3775296), y tres SNPs en el exón 4: dos mutaciones sinónimas (rs764010322 y rs3775290) y una mutación no sinónima (rs3775291) que induce la variación L412F en la proteína. No se encontró ninguna asociación entre estos cuatro SNPs y el desarrollo de LM al evaluarlo en contexto de infección simple ni en coinfección. Tras analizar la estructura poblacional de la muestra colombiana aquí estudiada, se encontró que el

comportamiento de rs3775296, en el exón 2, y rs3775291, en el exón 4, es muy similar a lo reportado en otras poblaciones a nivel mundial ($p>0,05$). Por el contrario, la distribución de frecuencias de los polimorfismos rs764010322 y rs3775291 del exón 4, si evidenció diferencias significativas frente a otras poblaciones ($p<0,001$). Estas diferencias están dadas porque, para la variación rs764010322, se evidenció una mayor frecuencia de aparición de esta variación en la muestra de estudio que en otras poblaciones a nivel global y para rs3775291, se presentó la ausencia de uno de los tres alelos posibles que se han reportado para esta variación. Finalmente, se analizaron otras variables que pudieran estar asociadas con el desarrollo de la LM y se ratificó la asociación entre está y la presencia de LRV1+ y con la variable tratamiento para LC.

Palabras clave: *Leishmania*, *LRV1*, *TLR3*, *Leishmaniasis mucosa*, *Leishmaniasis cutánea*, *Polimorfismo de nucleótido único*, *rs3775296*, *rs764010322*, *rs3775291*, *rs3775290*, *Colombia*.

Identification and association of Toll-Like Receptor 3 polymorphisms with the development of mucosal Leishmaniasis against the coinfection *Leishmania* spp. - Leishmania RNA Virus 1

ABSTRACT

Leishmaniasis is a vector-borne disease produced by *Leishmania* parasites with three main clinical forms of the disease, cutaneous (CL), mucosal (ML), and visceral Leishmaniasis. CL causes skin lesions, papules, and ulcers, while ML causes ulcerative lesions on nasal and oropharyngeal mucosa. Usually, ML is preceded by CL, and some authors refer to it as a metastatic progression of the disease. The causes of ML remain unknown, although the presence of Leishmania RNA virus 1 (LRV1) in the parasite has been associated with the development of ML. Indeed, it has been suggested that the recognition of LRV1 by the endosomal pattern recognition receptor (PRR) TLR3 induces an antiviral response that allows the parasite's persistence and dissemination in the host. TLR3 gene has several single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with resistance or susceptibility to viral infectious diseases. This work evaluated whether TLR3 SNPs are associated with ML development in infection produced by *Leishmania* spp. or *Leishmania* spp-LRV1 coinfection. The study was designed as a case-control study and TLR3 exons 2, 3, and 4 were genotyped. The presence of SNPs on TLR3 was analyzed in a Colombian population of 60 controls (CL diagnosed patients without mucosal compromise) and 27 cases (ML diagnosed patients) and the potential association between the SNPs and the clinical outcome were evaluated by comparing the allelic and genotypic frequencies for those SNPs. Other variables that could be associated with ML were also evaluated: sex, age, and treatment, among others; the genetic structure of TLR3 in the Colombian population in the context of other populations genotypes and haplotypes such as European, African, Asian, and Latin-American. Four SNPs were found between the studied sample: one exon 2, in the 5'UTR region (rs3775296), and three on exon 4 [two synonym mutations (rs764010322 y rs3775290) and one non-synonym mutation (rs3775291) that produced the L412F change in the protein]. There was no association observed between the found SNPs and the development of ML. The genetic population structure shows that rs3775296, on exon 2, and rs3775291, on exon 4, had a similar frequency to the world populations analyzed ($p>0,05$) while rs764010322 and rs3775291 had a significantly different frequency to world populations ($p<0,001$). Those differences are due to a higher frequency of rs764010322 variation and to the absence of one of the three possible alleles reported to rs3775291 into the studied population. Finally, other

XI

variables associated with the clinical development of the disease were analyzed and the association between LRV1 presence and ML development was confirmed as the potential association between absent or incomplete treatment for CL event and ML appearance.

Key words: *Leishmania, LRV1, TLR3, Mucosal leishmaniasis, Cutaneous leishmaniasis, Single nucleotide polymorphism, rs3775296, rs764010322, rs3775291, rs3775290, Colombia.*

Tabla de Contenido

Declaración de obra original	VI
Agradecimientos	VII
Financiación	VIII
Resumen	IX
Abstract	XI
Lista de Figuras	XVI
Listas de Tablas	XVIII
Lista de abreviaturas	XIX
1 Introducción.....	20
2 Problema de investigación.....	22
3 Objetivos	24
3.1 Objetivo general	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 Marco teórico.....	25
4.1 Generalidades Leishmaniasis.....	25
4.1.1 Agente infeccioso.....	25
4.1.2 Leishmania RNA Virus 1 (LRV1)	27
4.1.3 Cuadros clínicos en humanos	29
4.1.4 Epidemiología	30
4.2 Respuesta inmune	31
4.2.1 Respuesta inmune a <i>Leishmania</i> spp.....	31
4.2.2 Microambientes infecciosos y su implicación en la respuesta inmune	37
4.3 Receptores tipo Toll (TLRs).....	39
4.3.1 Generalidades de los TLRs.....	39
4.3.2 Caracterización de TLR3.....	40

4.3.3	TLRs y LRV1 en el contexto de la infección por <i>Leishmania</i> spp.	44
4.3.4	Polimorfismos de TLR3 y respuesta a virus	47
5	Metodología.....	50
5.1	Consideraciones éticas	50
5.2	Tipo de estudio, criterios de inclusión y definición de variables	50
5.3	Tamaño y cálculo de la muestra.....	53
5.4	Genotipificación gen TLR3	53
5.5	Análisis estadístico.....	56
6	Resultados	58
6.1	Caracterización de la población de estudio	58
6.2	Evaluación de condiciones de PCR, purificación y secuenciación para la obtención de secuencias de TLR3	60
6.3	Amplificación y genotipificación.....	63
6.4	Polimorfismos de TLR3 en población colombiana.....	65
6.5	Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa	68
6.6	Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa en el contexto de coinfección <i>Leishmania</i> spp. - LRV1	70
7	Discusión.....	73
8	Conclusiones.....	81
9	Perspectivas y limitaciones del estudio	82
10	Referencias	83
11	Anexo 1 – Análisis estadísticos	101
11.1	Caracterización de la población de estudio	101
Sexo	101
Edad a la que adquirió LC.....		101
Tratamiento para LC.....		101
Tipo de tratamiento.....		102

Falla Terapéutica	102
Especie de <i>Leishmania</i>	103
LRV1	103
11.2 Polimorfismos de TLR3 en población colombiana	104
Equilibrio Hardy-Weinberg	104
Muestra de estudio vs Población Latinoamericana	105
Muestra de estudio vs Población Europea	107
Muestra de estudio vs Población Africana	108
Muestra de estudio vs Población Asiática	110
Muestra de estudio vs Población Africana	112
11.3 Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa	113
Frecuencias alélicas	113
Frecuencias Genotípicas	115
11.4 Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa en el contexto de coinfección <i>Leishmania</i> spp. - LRV1....	116
Frecuencias alélicas	116
Frecuencias Genotípicas	118
12 Anexo 2 – Identificación de SNPs en electroferogramas	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	27
Figura 2. Respuesta inmune en Leishmaniasis.	36
Figura 3 Estructura general de un receptor Toll-like	40
Figura 4 Localización y especificidad de los diferentes TLRs	40
Figura 5. Localización y estructura general de TLR3.....	42
Figura 6 Vías de señalización de los TLRs	43
Figura 7 Estructura tridimensional del ectodominio de TLR3	43
Figura 8 Modelo de interacción <i>L. guayanensis</i> – LRV1 – TLR3 propuesto por (Ives et al., 2011).....	45
Figura 9. Diagrama de localización y estructura del gen TLR3, así como sitios de anillamiento de primers implementados en PCR.....	54
Figura 10. Distribución de edad a la hora de adquirir LC en casos (LM) y controles (LC)	58
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Comparación de la amplificación de un fragmento problemático de 800bp utilizando Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) en conjunto con su respectivo Buffer HiFi, buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ y buffer KCl.....	61
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Comparación de la amplificación del exón 4 (2200bp) en diferentes condiciones frente al uso de DMSO 5% y Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), tras el incremento del tiempo de extensión.	62
Figura 13. Locación SNPs evidenciados en este estudio en el gen TLR3.....	65
Figura 14. Distribución de frecuencias alélicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en los casos (LM) y controles (LC).	69
Figura 15. Distribución de frecuencias genotípicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en los casos (LM) y controles (LC).....	70

Figura 16. Distribución de frecuencias alélicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en casos (LM) y controles (LC) LRV1+. 71

Figura 17. Distribución de frecuencias genotípicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en casos (LM) y controles (LC) LRV1+. 72

LISTAS DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de variables analizadas en este estudio	52
Tabla 2. Primers usados en la amplificación por PCR y secuenciación de los exones dos, tres y cuatro del gen TLR3 (Deeba et al., 2019)	55
Tabla 3. Programas y premezclas implementados para la amplificación de los exones 2, 3 y 4 de TLR3	55
Tabla 4. Resumen y comparación de características clínicas y epidemiológicas entre los grupos de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis mucosa (casos) y con Leishmaniasis cutánea (LC).....	59
Tabla 5. Distribución de frecuencias alélicas del polimorfismos (SNPs) evidenciados en el gen TLR3 en la totalidad de la muestra.	64
Tabla 6. Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) observadas en gen <i>TLR3</i> en pacientes con Leishmaniasis cutánea (controles) y frecuencias reportadas por NCBI ALFA (<i>National Center for Biotechnology Information Allele Frequency Aggregator</i>) y en ExAC (<i>The Exome Aggregation Consortium</i>) para diferentes grupos poblacionales.....	67
Tabla 7. Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con Leishmaniasis cutánea (LC) y pacientes con Leishmaniasis mucosa (LM).....	68
Tabla 8. Distribución de frecuencias genotípicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con Leishmaniasis cutánea (LC) y pacientes con Leishmaniasis mucosa (LM).....	69
Tabla 9. Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con Leishmaniasis cutánea (LC) y pacientes con Leishmaniasis mucosa (LM) que presentan Leishmania RNA virus 1 (LRV1+)	71
Tabla 10. Distribución de frecuencias genotípicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con Leishmaniasis cutánea (LC) y pacientes con Leishmaniasis mucosa (LM) que presentan Leishmania RNA virus 1 (LRV1+)	72

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
CD	Cúmulo de diferenciación
<i>CDFLA</i>	Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta
<i>DAMP</i>	Patrón molecular asociado a daño
<i>DC</i>	Célula Dendrítica
<i>DNA</i>	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
<i>dsRNA</i>	Double stranded RNA (RNA bicatenario)
<i>IFN</i>	Interferón
<i>IL</i>	Interleucina
<i>iNOS</i>	Óxido nítrico sintasa
<i>L.g</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<i>LC</i>	Leishmaniasis cutánea
<i>LM</i>	Leishmaniasis mucosa
<i>LPG</i>	Lipofosfoglicanos
<i>LRR</i>	Repeticiones ricas en leucina
<i>LRVI</i>	Leishmania RNS virus 1
<i>MCP-1</i>	Proteína quimio-atrayente de monocitos 1
<i>MΦ</i>	Macrófago
<i>NO</i>	Óxido Nítrico
<i>NK</i>	Natural killer
<i>PAMP</i>	Patrón molecular asociado a patógenos
<i>Poly IC</i>	Ácido poliriboinospinico-polirribocitidílico
<i>PRR</i>	Receptor de reconocimiento de patrones
<i>OR</i>	Odd Ratio
<i>ORF</i>	Open Reading frame (Marco abierto de lectura)
<i>RNA</i>	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
<i>RNS</i>	Reactive nitrogen species (Especies reactivas de nitrógeno)
<i>ROS</i>	Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
<i>ssRNA</i>	Single stranded RNA (RNA monocatenario)
<i>Th</i>	Linfocitos T helper (CD4+)
<i>TIR</i>	Dominio de homología del receptor Toll/Interleukin-1
<i>TLR</i>	Toll-Like Receptor

1 INTRODUCCIÓN

La presente investigación es un estudio de asociación genética enfocado a la investigación de inmunopolimorfismos que puedan relacionarse con el desarrollo de LM. La Leishmaniasis, es una enfermedad tropical desatendida presente en cerca de 90 países a lo largo de la región tropical y sub tropical (Centers for disease control and prevention (CDC), 2020), es una enfermedad parasitaria transmitida por vector y se estima que anualmente se reportan entre 700.000 y 1.2 millones casos nuevos alrededor del mundo. En América, la epidemiología de la enfermedad no es tarea sencilla debido a la gran diversidad de reservorios, vectores y especies de *Leishmania* circundantes; adicionalmente, se ha establecido, como factores de riesgo asociados a una mayor incidencia de la infección: las malas condiciones socioeconómicas, malnutrición, alteraciones medioambientales y cambio climático; condiciones presentes de manera cotidiana en el neotrópico. En América, las presentaciones clínicas mayoritarias de la Leishmaniasis son aquellas de tipo tegumentario (WHO, 2020). Se presenta principalmente LC, pero eventualmente puede complicarse y desarrollar una LM, la cual conlleva a la destrucción de membranas mucosas en las cavidades nasal y/u oral y favorece en gran medida la aparición de infecciones secundarias que pueden ser altamente perjudiciales para quien las padece (David & Craft, 2009). Diversos estudios asociados a su epidemiología y manifestaciones clínicas se han efectuado; sin embargo, los mecanismos moleculares que conllevan a su desarrollo no se conocen plenamente.

Este estudio hace parte del proyecto marco titulado: "Determinación de la asociación entre la presencia de Leishmanivirus 1 (LRV-1) y el desarrollo de leishmaniasis mucosa en Colombia", financiado por Colciencias, el cual tiene como objetivo evaluar la asociación de LRV-1 con el desarrollo de LM y determinar si éste puede actuar como factor de pronóstico del desarrollo de la enfermedad. La presente investigación aporta información relevante para el conocimiento de la génesis de la LM en la medida en la que evalúa si características genéticas del individuo pueden estar asociadas, de igual forma, con el desarrollo clínico de la enfermedad. En este trabajo se analiza la posible asociación de inmunopolimorfismos en el receptor TLR3, el cual se ha visto asociado al reconocimiento de LRV-1 en contexto de infección por *Leishmania* y que, adicionalmente, se ha implicado como agente asociado al desarrollo de LM. Para ello se efectuó un estudio retrospectivo de casos y controles, en el cual se partió de una muestra de 96 pacientes colombianos, 28 diagnosticados con LM y 68 diagnosticados con LC, cuyas muestras se encontraban depositadas el biobanco del Centro dermatológico Federico Lleras Acosta. Se efectuó

la genotipificación del gen codificante para TLR3 en dichas muestras, a partir de la amplificación de la región exónica del gen y su posterior secuenciación mediante electroforesis en capilar, y se evaluó la asociación de los SNPs encontrados con el desarrollo de la enfermedad. Ese trabajo es pionero en el estudio de TLR3 en población colombiana, siendo el segundo en reportar datos de frecuencias alélicas y genotípicas de éste; por lo que además de la evaluación de la asociación entre los SNPs reportados y el desarrollo de LM, se efectuaron también análisis poblacionales que aportan al entendimiento de la estructura genética de dicho gen de la población colombiana.

2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad, causada por parásitos del género *Leishmania*, que presenta diferentes manifestaciones clínicas. En Colombia, las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad son la LC y la LM que, para 2019, reportaron 5015 casos y 65 casos, respectivamente (Agudelo Chivatá, 2019b, 2019a). La LC se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas, principalmente pápulas indoloras en la piel, que pueden evolucionar y transformarse en úlceras, las cuales favorecen la aparición de infecciones secundarias (Bailey & Lockwood, 2007). En algunos casos, la LC puede complicarse desarrollando una LM. Por otro lado, las lesiones que se presentan en la LM suelen ser principalmente úlceras en la cavidad oral y/o nasofaríngea, que pueden evolucionar en edemas nasales y gingivales, perforación del septum nasal y periodontitis. Estas lesiones mucosas pueden producir desfiguración y obstrucción de vías aéreas y favorecen, en mayor medida que la LC, la aparición de infecciones secundarias (David & Craft, 2009).

El mecanismo por el cual se desarrolla la LM no está plenamente dilucidado. No obstante, algunos estudios han relacionado la aparición de esta manifestación clínica con la presencia de Leishmania RNA Virus 1 (LRV1) en el parásito infectante. LRV1 es un virus perteneciente a la familia Totiviridae, cuyo genoma está compuesto por un RNA de doble cadena (dsRNA) que se encuentra rodeado por una cápside proteica de aproximadamente 40nm de diámetro y que se ubica en el citoplasma parasitario (de Souza et al., 2014; S. Scheffter et al., 1994).

En modelos animales se ha evidenciado una asociación entre la capacidad diseminadora y productora de lesiones secundarias de la cepa infectante *Leishmania* y la presencia de LRV1 en el parásito (Ives et al., 2011) y que la presencia de dicho virus puede inducir una respuesta inflamatoria exacerbada similar a la que se evidencia en la LM (Kariyawasam et al., 2017). Esto ha llevado a la formulación de estudios cuya intención es dilucidar el mecanismo mediante el cual LRV1 puede promover la complicación de la LC y la posible aparición de una LM en pacientes.

Evaluando los mecanismos inmunológicos asociados a la coinfección *Leishmania*-LRV1 en modelo murino, se evidenció que la respuesta era dependiente del Toll-like receptor 3 (TLR3), el cual es un receptor endosomal de reconocimiento de RNA bicatenario (Eren et al., 2016; Ives et al., 2011). Dicho receptor activa una cascada de señalización asociada al adaptador TRIF, quien activa diversos factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B, factores de transcripción de citoquinas proinflamatorias, pero principalmente a IRF-3, que induce la transcripción de interferones (IFN) de

tipo I (Kawai & Akira, 2007), lo cual favorece la persistencia de la infección por *Leishmania* y la aparición de lesiones secundarias (Rossi et al., 2017).

Esta respuesta anti viral, mediada por IFNs tipo I, también puede generarse ante la coinfección con otros virus exógenos (Rossi et al., 2017), por lo que la complicación de la infección por *Leishmania* spp, podría estar dada por la respuesta antiviral generada por el hospedero, más que por la identidad del virus infectante. Un estudio de casos y controles, previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación, evidenció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de LRV1 y el desarrollo de una LM. Se evidencio un OR de 6,32 (IC95% 1.248 – 27.00), lo que se puede interpretar como un riesgo 6,32 veces mayor de desarrollar LM si el parásito infectante posee LRV1. Dicho estudio representa el primer reporte de frecuencias de aparición de LRV1 en población colombiana diagnosticada con leishmaniasis, en este se evidencia una frecuencia de aparición de LRV1 en el 16,5% de las muestras analizadas, en el 33,3% de las muestras diagnosticadas con LM y en el 8,6% de as muestras diagnosticadas con LC (Pazmiño et al., 2021). Sin embargo, vale la pena resaltar que algunos controles poseían la coinfección parásito-virus y más aún, que una proporción de los pacientes que desarrollaron la LM no evidenciaron dicha coinfección. Esto sugiere que la presencia de LRV1, si bien está asociada a la progresión hacia una LM, no es absolutamente determinante para la complicación de la enfermedad y que pueden existir otros factores asociados a su desarrollo, como infecciones secundarias con otros virus o alteraciones en la respuesta inmune de cada individuo frente al virus.

El correcto reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) por los TLRs, es necesario para llevar a cabo la cascada de señalización que tendrá como consecuencia una respuesta inmune que le permita al organismo huésped combatir el patógeno. La presencia de polimorfismos en los TLRs puede alterar la interacción de este con sus PAMPs y, por tanto, puede perturbar la respuesta inmune que se debería generar (Akashi-Takamura & Miyake, 2006). Se ha evidenciado que polimorfismos como la sustitución de la Leucina 412 por Fenilalanina (L412F) en TLR3 induce susceptibilidad a infecciones por Herpes virus simple (Yang et al., 2012), citomegalovirus (Nahum et al., 2011; Studzińska et al., 2017), entre otros.

Teniendo en cuenta que el contexto genético del hospedero podría favorecer el desarrollo de LM y que se ha reportado una asociación entre la LM y la coinfección con LRV1, surge la pregunta ¿Pueden las variaciones genéticas en el receptor endosomal TLR3 modular el desarrollo de la LM asociada o no a la coinfección *Leishmania* spp – LRV1?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de polimorfismos de TLR3 y su posible asociación con el desarrollo de Leishmaniasis mucosa

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las frecuencias y distribución de polimorfismos de TLR3 en DNA extraído a partir de muestras clínicas con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea y mucosa.
2. Determinar si existe una relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de dicho gen y el desarrollo de Leishmaniasis cutánea o mucosa.
3. Determinar si existe una relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 en las muestras clínicas con la infección por LRV1 y el desarrollo de Leishmaniasis cutánea o mucosa

4 MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES LEISHMANIASIS

4.1.1 Agente infeccioso

Leishmania (Ross, 1903) es un género de parásitos protozoarios pertenecientes a la familia Trypanosomatidae (Doflein, 1901), orden Trypanosomatida (Kent, 1880) y Clase Kinetoplastida (Honigberg, 1963) (Bruschi & Gradoni, 2018; Lumsden & Evans, 1976). Los Kinetoplastidos, son organismos flagelados que se caracterizan por la presencia de una única mitocondria que se extiende a lo largo del cuerpo celular, la cual condensa su DNA mitocondrial en una zona Feulgen¹ positiva denominada kinetoplasto, este organelo se ubica de forma cercana al cuerpo basal en la base del bolsillo flagelar. Dentro de la clase Kinetoplastida, se encuentran diferentes órdenes de protozoarios, ya sea de vida libre o parasitaria, en donde el número y la disposición de sus flagelos resulta una característica taxonómica de gran relevancia. El orden Trypanosomatida, se caracteriza por la presencia de un único flagelo locomotor, el cual puede estar libre o anclado al cuerpo celular del protozoario mediante una membrana ondulante. Dentro de este orden se alojan dos géneros de parásitos de relevancia en salud humana: *Leishmania* y *Typanosoma* (Lumsden & Evans, 1976).

La especies del género *Leishmania* con importancia médica, a su vez se encuentran clasificadas en dos grandes subgéneros: *Leishmania (Viannia)*, parásitos restringidos a Sur América cuyo desarrollo en el vector se efectúa en la parte posterior del intestino; *Leishmania (Leishmania)*, el cual agrupa especies con distribución global, que se desarrollan en la parte anterior del intestino del vector (Bruschi & Gradoni, 2018).

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* infecta dos tipos de hospederos: un hospedero invertebrado, también denominado vector de transmisión, y un hospedero vertebrado. Para el caso de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*, los vectores de transmisión de importancia médica son dípteros hematófagos pertenecientes diferentes géneros y especies de la subfamilia Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), entre los géneros mayoritariamente estudiados como vectores implicados en la transmisión de estos parásitos se encuentran *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Ferro et al., 2015;

¹ Tinción específica para DNA que permite no solo su observación sino también su cuantificación (Chieco & Derenzini, 1999)

Lainson et al., 1994). En cuanto a los hospederos vertebrados no humanos, estos subgéneros se han encontrado parasitando roedores, primates, cánidos, folívoros, entre otros (Lainson et al., 1994).

El ciclo de vida en el vertebrado inicia cuando el insecto hematófago inocula promastigotes metacíclicos de *Leishmania* spp, estadio infectivo del parásito, en el hospedero vertebrado durante su proceso de alimentación (Bañuls et al., 2007; CDC, n.d.). El promastigote presenta una morfología típica dada por un cuerpo celular alargado, el kinetoplasto se ubica hacia el extremo anterior de este y su flagelo se extiende de forma libre, carente de membrana flagelar, desde el bolsillo flagelar ubicado adyacente al kinetoplasto (Rogers, 1904, 1906). Una vez en el hospedero vertebrado, los parásitos son fagocitados por macrófagos (M ϕ) y neutrófilos (Bruschi & Gradoni, 2018) e incluidos en un fagosoma. Este proceso induce un cambio fisiológico y morfológico que genera la transformación de promastigotes a amastigotes, es decir que adoptan una estructura celular esférica y carente de flagelo; además, expresan una batería metabólica distinta que les permite adaptarse a un nuevo ambiente cuya temperatura es más elevada y su pH más bajo (Alcolea et al., 2014). Los amastigotes inducen algunas alteraciones en los procesos microbicidas de la célula fagocítica, lo cual transforma el fagosolisosoma en una vacuola parasitófora que permite la supervivencia y reproducción del parásito (Awasthi et al., 2004; Bañuls et al., 2007; Handman & Bullen, 2002). Los amastigotes se reproducen al interior de los M ϕ y salen de estos para re-infectar otras células fagocíticas. El ciclo continuará en el vector si al momento de la ingesta de sangre de un hospedero vertebrado, éste tiene oportunidad de ingerir células fagocíticas infectadas. En ese caso, los amastigotes ingresan en el tracto digestivo del insecto y se diferencian en promastigotes procíclicos (Bruschi & Gradoni, 2018). Los promastigotes se anclan a la parte media, para el caso de las especies del subgénero *L. (Leishmania)*, o a la parte posterior del intestino, para el caso de *L. (Viannia)*, insertando el flagelo entre microvellosidades intestinales (Killick Kendrick et al., 1974); allí se genera un nuevo proceso replicativo que permite la reproducción de los parásitos y la diferenciación a estadios infectantes conocidos como promastigotes metacíclicos, los cuales posteriormente migrarán a glándulas salivares para su inoculación en el hospedero vertebrado (Figura 1). Los promastigotes en el intestino secretan un gel que produce la obstrucción del tracto digestivo del insecto, induciendo un problema alimenticio que obliga al insecto a intentar alimentarse con mayor frecuencia, picando repetidas veces e incrementando la tasa de inoculación de los parásitos en los hospederos vertebrados (Bruschi & Gradoni, 2018; Killick-Kendrick et al., 1988).

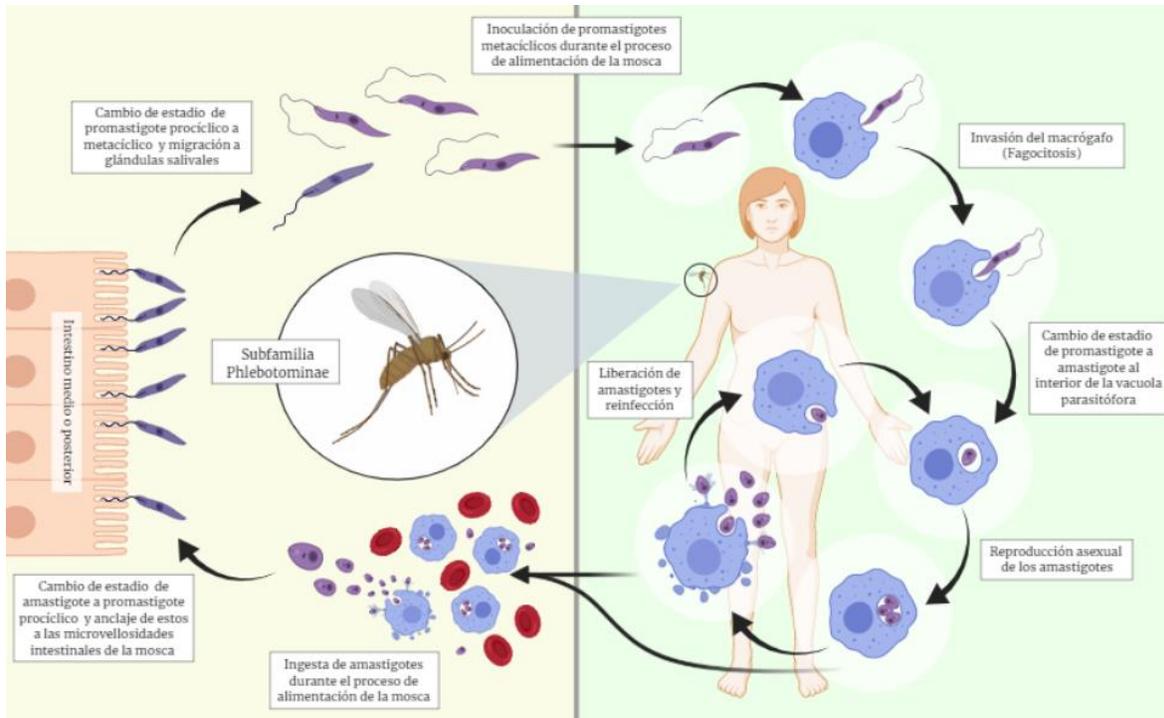


Figura 1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Imagen desarrollada con BioRender.com)

4.1.2 *Leishmania* RNA Virus 1 (LRV1)

En 1979, Croft y Molyneux realizaron, en el departamento de parasitología de la escuela de medicina tropical de Liverpool, estudios de ultra estructura del parásito *Leishmania hertigi* (Herrer, 1971), especie inicialmente descrita en Panamá en el puercoespín *Coendou rothschildi*; en este estudio evidenciaron la presencia de partículas similares a virus, tanto en los promastigotes en cultivo como en amastigotes obtenidos de la infección experimental de hámster, aunque en menor proporción en estos últimos (Croft & Molyneux, 1979). Esto abrió la puerta a investigaciones cuyo objetivo era lograr caracterizar estas partículas. Posteriormente, Tarr y colaboradores (1988) iniciaron la caracterización preliminar de virus presentes en *Leishmania*, allí concluyeron que el virus, que ellos denominaron LR1, debe ser un virus de RNA de cadena sencilla. Posteriormente, con otros estudios enfocados en la caracterización de este virus, se encontró que eventualmente podría haber RNA de doble cadena en el virus y que esto podría estar asociado a la presencia de una RNA polimerasa viral (Widmer et al., 1989). Sin embargo, estos resultados serían posteriormente debatidos y puntualizados al encontrar que en el citoplasma de *L. guyanensis* se encontraban RNA tanto de cadena sencilla como de doble cadena y que, quizá, la incorrecta caracterización del virus como un virus de RNA de cadena sencilla podría haberse debido a las metodologías implementadas

en los primeros ensayos (Weeks et al., 1992). A esta puntualización la siguió, de manera casi inmediata, la primera caracterización del genoma viral. Stuart y colaboradores (1992) secuenciaron y ensamblaron el genoma viral, lo que permitió describir su estructuración. Se encontró la presencia de tres ORF (Open Reading Frame) y, además de evidenciarlos, los autores identificaron las posibles proteínas codificadas a partir de estos: el segundo ORF, codifica para proteínas de la cápside, mientras el tercero codifica para una RNA – polimerasa dependiente de RNA (RDRP), lo que corrobora los resultados obtenidos por Widmer y colaboradores (1989). Para el primer ORF, muy cercano al extremo 5', el análisis bioinformático no permitió encontrar una proteína que se asemejara a la que se traduciría a partir de este. Dentro de las características interesantes de este genoma viral, identificadas por Stuart y colaboradores (1992), está: (1) la ausencia del cap, estructura importante para el acople de la maquinaria de traducción eucariota, (2) la ausencia de secuencia líder de splicing, la cual media la adición del cap en Tripanosomátidos (Liang et al., 2003; Perry & Agabian, 1991), (3) la presencia de 5' monofosfatos y (4) la posible formación de estructuras secundarias en el RNA, las cuales especulan que podrían inducir un deslizamiento del tRNA para corregir el marco de lectura +1 en el que se encuentra el ORF3 respecto al 2 para la producción de la proteína fusión *gag-pol* (Stuart et al., 1992).

Durante los años posteriores a estas primeras caracterizaciones de LRV1 continuaron las investigaciones enfocadas a generar más conocimiento sobre el tema. Dentro de estas investigaciones vale la pena destacar la secuenciación de más genomas virales que permitió la identificación de secuencias conservadas importantes para la correcta replicación del virus como lo son: la región UTR 5', a nivel de nucleótidos, y zonas de los ORF 2 y 3, a nivel de aminoácidos. Esto además permitió identificar la regularidad en la aparición conservada de algunas estructuras secundarias, lo cual respalda la hipótesis del deslizamiento del tRNA previamente propuesta (S. Scheffter et al., 1994). También vale la pena resaltar la propuesta filogenética de Widmer y Dooley (1995) en donde hacen un paralelo entre desarrollo filogenético de algunas cepas de LRV1 y cepas de *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, tomando como grupos externos *L. major* y LVR2, previamente descrita como el primer tipo de LRV infectando *Leishmania* en el viejo mundo, pero que difiere significativamente de LRV1 (Cadd et al., 1993; S. M. Scheffter et al., 1995); en este análisis se evidenció, en cierta medida, una coevolución entre estos dos organismos, LRV1 y *Leishmania* (Widmer & Dooley, 1995).

En los años subsiguientes, se efectuaron más estudios relacionados con la caracterización de LRV1, así como estudios enfocados a evaluar la presencia de este virus en pacientes con Leishmaniasis. Para ello se implementó la RT-qPCR como estrategia que permitiera identificar la presencia del

virus en biopsias de pacientes con Leishmaniasis (Ogg et al., 2003; Saiz et al., 1998). A partir de esto se planteó una nueva hipótesis referente a la implicación de la presencia de LRV1 en pacientes con dicha enfermedad, hipótesis que encaminaría algunas de las investigaciones de los siguientes años: “Dado que la especie de parásito determina la manifestación clínica y los factores del huésped, como la edad, el sexo y el estado inmunitario, pueden afectar la progresión de la enfermedad, es posible que el LRV sea otro factor que esté afectando la progresión de la enfermedad” (Ogg et al., 2003, p. 313).

4.1.3 Cuadros clínicos en humanos

Leishmaniasis es la enfermedad producida tras la infección por *Leishmania* spp. Esta enfermedad tiene principalmente tres manifestaciones clínicas: LC, LM y Leishmaniasis visceral, también conocida como enfermedad de Kal-Azar (David & Craft, 2009; van Griensven & Diro, 2012). Estas manifestaciones clínicas aparecen tras un periodo de incubación muy variable, desde un día hasta incluso meses o años (Bailey & Lockwood, 2007)

La LC se caracteriza por la formación de una o más pápulas, las cuales pueden evolucionar en úlceras, cuyo borde es elevado y endurecido, y, en algunas ocasiones, presentan una costra de exudado seco. Estas lesiones suelen no ser dolorosas a menos que se genere una infección bacteriana secundaria en estas (Bailey & Lockwood, 2007; Hepburn, 2000). Existen algunas variaciones en la manifestación clínicas de la LC dependiendo de la severidad, la evolución y la longevidad de las pápulas presentadas. La LC aguda contempla la formación de úlceras a partir de las pápulas, como ya se mencionó. Estas pápulas y úlceras pueden aparecer en gran número dispersas o concentradas rodeando placas eritematosas, lo que catalogaría esta presentación clínica como LC crónica (Dowlati, 1996). La longevidad de las lesiones estará dada por la resolución de estas como efecto de la acción del sistema inmune (Hepburn, 2000), sin embargo, existe la posibilidad de que aparezcan nuevas pápulas sobre las lesiones ya sanadas, lo que se conoce como Leishmaniasis recidivante (Dowlati, 1996). Estas lesiones pueden ser muy localizadas o, en el caso de la LC difusa, pueden extenderse por todo el rostro o, incluso, por todo el cuerpo (Dowlati, 1996).

La LM es una presentación de la enfermedad que suele ser precedida por una LC. En esta se desarrollan ulceraciones en las cavidades oronasal y faríngea y, en algunos casos, también se generan edemas nasales y gingivales, perforaciones al septum nasal y periodontitis (David & Craft, 2009; Goto & Lindoso, 2010); la afección tisular puede conllevar a la destrucción progresiva de la mucosa oronasal, faríngea y el cartílago facial, lo que tiene como resultado desfiguración, obstrucción de vías aéreas y una alta propensión a infecciones (David & Craft, 2009).

El cuadro clínico generado depende de factores como la especie de *Leishmania* infectante y la condición inmunológica del paciente. La LC es uno de los cuadros clínicos más comunes que se presentan ante la infección con *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. mexicana*, en el nuevo mundo, y *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) tropica*, en el viejo mundo (Hepburn, 2000; Llanos-Cuentas et al., 2008), aunque estas especies no son las únicas asociadas a la presentación cutánea. Las infecciones con *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) major*, así como con otras especies menos frecuentes asociadas a LC, pueden evolucionar y desarrollarse en LM (Goto & Lindoso, 2010).. A nivel mundial, la organización mundial de la salud reportó para 2018 aproximadamente 245 mil casos de Leishmaniasis tegumentaria, siendo el norte de sur américa, el norte de áfrica y medio oriente, las zonas mayormente afectadas (WHO, 2019).

4.1.4 Epidemiología

La Leishmaniasis es una enfermedad tropical que afecta principalmente a Latinoamérica, norte de África y sur de Asia. Frente a las formas tegumentarias de la enfermedad, es decir LC y LM, cada año se reportan entre 600.000 y 1 millón de casos nuevos y que cerca del 85% de los casos que se reportan de LC provienen de tan solo 10 países a nivel mundial, entre los cuales se encuentra Colombia; para el caso de LM, cerca del 90% de los casos se concentran en Brasil, Etiopía, Bolivia y Perú (WHO, 2021). Entre 2001 y 2019, la OPS registró 1.028.054 casos de LC y LM en américa. Durante 2019, Colombia fue el segundo país de américa con mayor número de casos registrados (5.907), después de Brasil quien registró 15.484; en estos dos países, junto con Perú, Nicaragua y Bolivia, presentan el 77% de los casos de la región (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

El Colombia, para el sexto periodo epidemiológico de 2021, el cual comprende la segunda mitad del mes de mayo y la primera del mes de junio, el instituto nacional de salud reporta 2252 casos de LC y 20 casos de LM, lo que significa que LC en Colombia tiene una incidencia de 19,19 casos por cada 100.000 habitantes y LM una incidencia de 0,17 por cada 100.0000. Los departamentos con más reportes de LC son Antioquia (413), Santander (273) y Guaviare, mientras que para LM son Meta (4), Guaviare (2) y Casanare (2). Esta enfermedad se presenta principalmente en zona rural, 78% de los casos de LC y 75% de LM corresponden a estas zonas, y afecta principalmente a población masculina, 75.5% de los casos de LC y 85% de los casos de LM con hombres. Los reportes evidencian que la población mayoritariamente afectada por dicha enfermedad corresponde a militares, 28,2% de los casos de LC y 25% de los casos de LM, y a agricultores, 17,3 de los casos de LC y 30% de los casos de LM (Gómez Gómez, 2021b, 2021a).

4.2 RESPUESTA INMUNE

4.2.1 Respuesta inmune a *Leishmania* spp.

La presentación clínica de la Leishmaniasis depende tanto de la especie infectante como de la condición inmunológica del paciente; este último factor cumple un rol fundamental en la presentación asintomática de la enfermedad, en donde la activación de macrófagos y una respuesta inmune exitosa logra mantener la infección sub clínica, evitando la aparición de sintomatologías (Sassi et al., 1999). La mayoría de las infecciones en áreas endémicas permanecen asintomáticas por largos periodos de tiempo e incluso pueden llegar a nunca presentar síntomas (H. W. Murray, 2002; van Griensven & Diro, 2012). Es por ello que se han efectuado varios estudios con el objetivo de dilucidar las interacciones entre el parásito y el sistema inmune del hospedero, ya que será esta interacción la que en gran parte medie el desarrollo de la enfermedad. Los modelos murinos han resultado sumamente importantes para estos estudios y es en ellos donde se ha desarrollado la mayoría de las investigaciones que se discutirán a continuación; sin embargo, cabe resaltar que estos modelos pueden facilitar el estudio de la infección por *Leishmania*, pero difícilmente simularán apropiadamente el desarrollo de la enfermedad en humanos, por lo que los resultados en estos obtenidos deben estar sujetos a comprobaciones subsiguientes en muestras humanas.

La interacción parásito hospedero en la infección por *Leishmania* se puede entender en 3 etapas: la fase inmediata, donde se genera el primer encuentro del hospedero con el parásito y su primer reconocimiento, la fase temprana, en donde se genera una respuesta inmune innata, y la fase tardía, donde se dispara la respuesta inmune adaptativa (Gómez, 2021).

La fase inmediata se desarrolla durante las primeras 4h luego de producirse la inoculación del parásito en el hospedero (Gómez, 2021). Cuando ingresan en el hospedero vertebrado, los promastigotes provenientes del vector infectan macrófagos y se diferencian en amastigotes. Para ello, *Leishmania* interactúa con los mecanismos de fagocitosis de sus células hospederas mediante el reconocimiento a través de receptores de superficie de los M ϕ (Figura 2.1) (Guy & Belosevic, 1993). Se han identificado varios mecanismos de entrada mediados por receptor. Por un lado, la opsonización de *Leishmania* juega un rol fundamental para su internalización en el M ϕ . Cuando la opsonización está dada por anticuerpos, el receptor Fc γ R media el reconocimiento de estos para inducir la fagocitosis, promoviendo tanto el reordenamiento de citoesqueleto como la activación del complejo de oxidación NADPH (Ueno & Wilson, 2012). Esta opsonización también puede estar mediada por proteínas del sistema complemento. La proteína C3 puede unirse directamente a algunas moléculas ajenas al organismo hospedero, como lo son los lipofosfolípidos (LPG) que se

extienden por todo el cuerpo celular del parásito, e hidrolizarse espontáneamente, activándose y permitiendo la formación de los complejos C3 y C5 convertasa para, finalmente, mediar la formación del complejo de ataque a membrana y eliminar el agente patógeno (Abbas et al., 2015; Kindt et al., 2007); sin embargo, *Leishmania* expresa la proteasa GP63 en su superficie, la cual puede hidrolizar la forma activa C3b inactivándola como iC3b; esta última actúa como opsonina y media la fagocitosis del parásito a través de receptores de complemento en los M ϕ , sin activar el complejo de ataque a membrana, evitando así la eliminación del parásito y favoreciendo su internalización en la célula hospedera (Bogdan & Röllinghoff, 1998; Ueno & Wilson, 2012). Por otro lado, receptores tipo lectina o integrina, como el receptor de manosa y el receptor de fibronectina, respectivamente, también pueden mediar el proceso de entrada de *Leishmania* al M ϕ . Los receptores de tipo lectina interactúan con carbohidratos y con proteínas del sistema complemento para la activación de la vía de las lectinas (Kindt et al., 2007); dadas estas características, se propone que el receptor de manosa podría reconocer los LPGs de membrana del parásito o podría actuar de manera sinérgica con el receptor de complemento para mediar la fagocitosis mediada por iC3b. El receptor de fibronectina, de manera similar, se postula que puede mediar la internalización del parásito debido a que (1) puede reconocer la proteasa GP63 expresada por el parásito o (2) podría reconocer directamente fibronectina opsonizante de éste. Factores como la especie de *Leishmania* o el estadio en el cual se encuentre al momento de la fagocitosis podrían determinar el mecanismo de reconocimiento del parásito para su fagocitosis, de forma tal que la acción sinérgica de varios de los receptores ya mencionados permitirán efectuar adecuadamente dicho proceso (Ueno & Wilson, 2012).

Inmediatamente después de la formación del fagosoma, este inicia su proceso de maduración. Durante este proceso, el fagosoma se fusionará con endosomas y lisosomas; esto está mediado por una serie de proteínas GTPasas denominadas Rab, que median la interacciones con citoesqueleto y entre endosomas, así como con otras proteínas asociadas al tráfico vesículas como las SNARE (Pauwels et al., 2017; Poirier & Av-Gay, 2015). Durante este proceso, es indispensable acoplar al fagolisosoma sistemas de acidificación y de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que, en conjunto con las enzimas líticas que provee el lisosoma, permitan la destrucción del agente patógeno (Figura 2.2); para ello, la acidificación del medio está dada por la incorporación de la ATPasa vacuolar (v-ATPasa), la producción de ROS requiere del complejo oxidativo NADPH y la de óxido nítrico (NO) de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Bogdan & Röllinghoff, 1998; Fairn & Grinstein, 2012; Pauwels et al., 2017). El acople de estas proteínas al fagosoma y fagolisosoma se ha relacionado con la presencia de balsas lipídicas en estos; estas zonas, ricas en esfingolípidos y colesterol, se forman durante el proceso de maduración del

fagosomas y actúan como anclaje de complejos proteicos (Dermine et al., 2001; Lodge & Descoteaux, 2004).

Leishmania utiliza el fagosoma de M ϕ y otras células fagocíticas como nicho para su desarrollo y reproducción. Las condiciones que impone el fagolisosoma, quizá, hayan generado presiones de selección que favorecieron el desarrollo de estrategias que permiten al parásito evitar su eliminación en este organelo (Alexander & Russell, 1992). Por otro lado, las adaptaciones del parásito a ambientes ácidos, como la posible expresión de bombas de protones en su membrana celular (Coombs & North, 2004; Jiang et al., 1994; Zilberstein et al., 1989; Zilberstein & Dwyer, 1988), la mejor adquisición de metabolitos necesarios para el parásito cuando este está inmerso en un ambiente ácido (Zilberstein et al., 1989) y el cambio de estadio impulsado por las variación en el pH del medio (Coombs & North, 2004), permiten plantear una segunda propuesta en la cual fueron estas características las que favorecieron la colonización del fagosoma como nicho de desarrollo de *Leishmania*. Si bien el desarrollo evolutivo de la interacción parásito – macrófago no es del todo claro, lo que sí es claro que *Leishmania* posee algunas características que favorecen su supervivencia en el huésped.

Los LPGs y la proteasa GP63, proteínas de superficie mayoritariamente expresadas por el parásito, juegan un rol fundamental en este proceso. Los LPGs han sido implicados en varios procesos asociados a la evasión de la muerte celular al interior del fagolisosoma. Además de expresarse en la superficie del parásito, estas moléculas pueden ser secretadas y posteriormente introducirse en las balsas lipídicas, lo cual induce su desacople; dada la importancia de dichas balsas lipídicas para el ensamblaje de complejos proteicos, los LPGs podrían, por este mecanismo, mitigar la maduración de fagosoma al evitar la unión de proteínas como Rab, NADPH oxidasa y v-ATPasa, lo cual impediría la acidificación y la producción de ROS en el fagosoma (Lodge & Descoteaux, 2004). Los LPGs también parecen interactuar con la proteína quinasa C (PKC), cuya activación está relacionada con la explosión oxidativa (Bogdan & Röllinghoff, 1998). Por otro lado, la GP63 también juega un papel protector para el parásito inmerso en el fagolisosoma, quizá degradando enzimas líticas allí presentes (Chaudhuri et al., 1989); adicionalmente, se ha visto que puede estar implicada en la disminución de ROS dentro del fagolisosoma (Bogdan & Röllinghoff, 1998), al impedir el ensamblaje del complejo NADPH, y en la disminución de NO, al impedir el reclutamiento de iNOS como NOX2 (Christine Matte et al., 2016).

Las células fagocíticas, además de fagocitar, procesar y presentar antígenos, cumplen un rol en la secreción de citoquinas y quimioquinas que modulan la respuesta inmune ante un patógeno (Figura 2.3); la producción de estas moléculas está mediada por la interacción de antígenos con receptores

de superficie o endosomales, o por la interacción de receptores con ligandos coestimuladores, lo que dispara cascadas de señalización que tienen como fin la transcripción, traducción, maduración y secreción de citoquinas (Abbas et al., 2015; Nares & Wahl, 2005). En la infección por *Leishmania*, las primeras células del sistema inmune que interactúan con el parásito son los macrófagos y neutrófilos (Awasthi et al., 2004; von Stebut & Tenzer, 2018), se ha evidenciado que, en modelos murinos, estas células producen quimioquinas como KC, MIP- α , MIP- β , CCL2, MIP-2 y TCA-3 (Filardy et al., 2014; Claudine Matte & Olivier, 2002; Müller et al., 2001); dichas quimioquinas están asociadas con promover la inflamación mediante el reclutamiento de diversos tipos celulares, principalmente monocitos, neutrófilos, células dendríticas (CD) y Natural Killer (NK), e incluso se han asociado a promover la secreción de citoquinas proinflamatorias (Fahey et al., 1992; Hol et al., 2010). Estos eventos ocurren durante la fase temprana de la infección, es decir entre las primeras 4h y 24h, donde el rol mayoritario lo cumple el sistema inmune innato (Gómez, 2021).

La secreción de citoquinas proinflamatorias es un evento crucial para determinar el curso de la infección con *Leishmania*, estas inducen la activación del sistema inmune adaptativo y modulan su dinámica durante la fase tardía de la infección, después del día 2 post infección (Gómez, 2021). TNF- α , INF- γ , G-CSF, IL-12, IL-18 y IL-6 son las citoquinas principalmente secretadas por células fagocíticas ante la infección con *Leishmania* (Awasthi et al., 2004; von Stebut & Tenzer, 2018), estas citoquinas son proinflamatorias y, en su mayoría, inducen una respuesta inmune de tipo celular, en donde los linfocitos CD4+, células NK, células NKT y otros leucocitos del sistema inmune innato juegan un rol fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune; a este tipo de respuesta inmune se le conoce como respuesta tipo Th1 (Abbas et al., 2015). Para el desarrollo de esta respuesta Th1, se ha evidenciado la relevancia que tiene la interacción entre las células dendríticas (CDs) y linfocitos T durante la sinapsis inmunológica; esto debido a que la producción y secreción de IL-12 por las CDs, principal citoquina inductora de Th1, está mediada por la interacción de los receptores co-estimuladores CD40 – CD40L durante el proceso de presentación antigénica en contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (McDowell et al., 2002; Tripathi et al., 2007; von Stebut & Tenzer, 2018).

Se ha reportado que la inducción de un perfil Th1 favorece la resolución de la infección, esto debido a que las citoquinas producidas durante una respuesta Th1, como el INF- γ producido por Linfocitos CD4+ T-bet (Linfocitos Th1), promueven la activación de macrófagos (M1) y la producción de óxido nítrico, factores importantes para la eliminación del parásito en el fagolisosoma (Abbas et al., 2015; Agudelo & Robledo, 2000; Mougneau et al., 2011). Esta respuesta Th1 no solo se desencadena a raíz de la acción secretora de las células del sistema inmune, células propias del

tejido infectado, como los queratinocitos; también parecen jugar un rol en la inducción de dicha respuesta mediante la secreción de agentes moduladores como IL-12 y IL-1 β (Ehrchen et al., 2010).

La activación de una respuesta inmune de tipo Th2, por otro lado, ha sido relacionada con el progreso de la infección. Mientras que el modelo murino C57BL/6, resistente a la infección por *Leishmania*, desencadena una respuesta Th1, la cual parece ser el factor crucial en su resolución de la enfermedad, la respuesta Th2 en ratones BALB/c está asociada a su susceptibilidad a la misma (Tripathi et al., 2007). La activación de esta respuesta está medida por la producción de citoquinas como IL-4, la cual regula negativamente la producción de citoquinas como IFN- γ e IL-12 (Kindt et al., 2007). La producción de IL-4 también induce la activación de Macrófagos de tipo 2 (M2) quienes inducen una respuesta anti inflamatoria (Abbas et al., 2015). Estos M ϕ tipo 2 tienen como característica la producción de arginasa que media la conversión de algunos metabolitos que pueden ser beneficiosos para la nutrición del parásito e inhibe la óxido nítrico sintasa, de esta forma recude los niveles de NO, el cual es un elemento importante para la eliminación del parásito en el M ϕ (Lopes et al., 2014; Raes et al., 2007; von Stebut & Tenzer, 2018).

No obstante, la respuesta de tipo Th2 no es el único mecanismo mediante el cual se genera susceptibilidad a la infección por *Leishmania*. Se ha evidenciado la producción considerable de IL-10 en ratones susceptibles BALB/c (Tripathi et al., 2007), una de las citoquinas reguladoras de mayor importancia, la cual es producida por M ϕ reguladores y linfocitos Th2 y Treg. Ésta, mediante la inhibición de IL-12, regula negativamente la producción de IFN- γ ; también inhibe la expresión de proteínas co-estimuladoras asociadas a MHC-II, lo cual igualmente afecta la producción de IL-12 (Abbas et al., 2015). Adicionalmente, en conjunto con la IL-4, activa macrófagos M2, cuyos efectos fueron discutidos previamente (von Stebut & Tenzer, 2018). Algunos estudios han sugerido que la producción de IL-10 está asociada al mecanismo de reconocimiento del parásito por el M ϕ ; la opsonización con IgG y el reconocimiento de estos anticuerpos mediante el Fc γ R parece ser uno de los mecanismos indispensables para este proceso (Kane & Mosser, 2001).

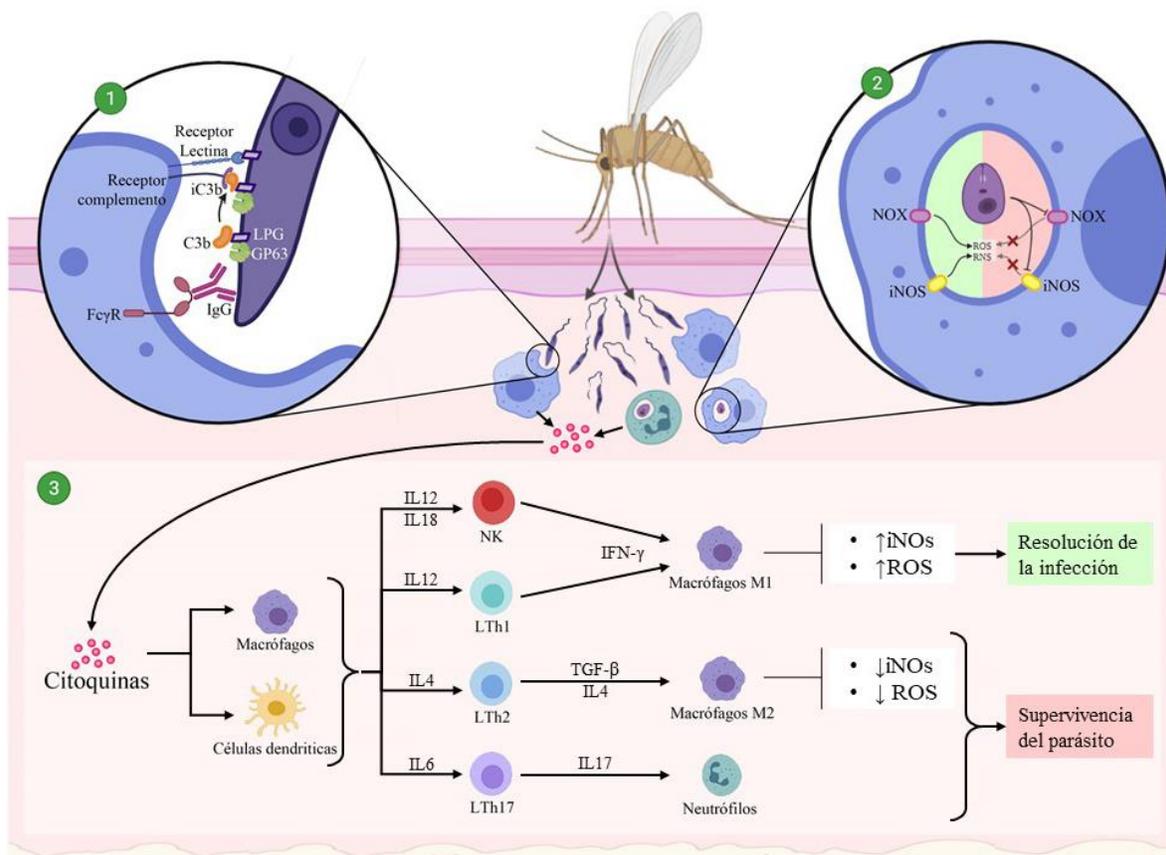


Figura 2. Respuesta inmune en Leishmaniasis. (1) Interacción temprana, mediada por receptores de superficie de los macrófagos y gracias a opsonización del parásito mediante anticuerpos o sistema complemento, induce fagocitosis del promastigote de *Leishmania*. (2) Una vez en el fagosoma, el parásito cambia de estadio a amastigote; la activación de enzimas productoras de ROS y RNS, además de la acción de enzimas líticas, permiten la lisis del parásito (verde), pero *Leishmania* tiene mecanismos de evasión de este proceso como la inhibición de dichas enzimas y de proteínas asociadas a la maduración del fagolisosoma (rojo). (3) Tras la interacción con células fagocíticas, estas generan citoquinas y quimioquinas que pueden polarizar la respuesta inmune hacia un perfil Th1 que favorece la resolución de la infección, o hacia un perfil Th2 o Th17 que favorecen la supervivencia del parásito. LPG: Lipofosfoglicanos, NOX: NADPH oxidasa; iNOS: óxido nítrico sintasa, LTh1: Linfocito T helper 1, LTh2: Linfocito T helper 2, LTh17: Linfocito T helper 17. (Imagen desarrollada con BioRender.com)

La activación de linfocitos T helper depende de tres eventos: (1) Presentación antigénica, (2) interacción con receptores co-estimuladores y (3) secreción - captación de citoquinas (Corthay, 2006). La presentación antigénica es uno de los procesos fundamentales para la activación de linfocitos T; ésta está dada en contexto MHC-II por células presentadoras profesionales. Para ello, se requiere el procesamiento antigénico de los epítopes del agente patógeno y su anclaje en el MCH. Tras la fagocitosis, la destrucción del patógeno al interior del fagolisosoma es el paso previo al procesamiento antigénico. *Leishmania* logra evitar la presentación antigénica por medio de varios mecanismos. En principio, y como ya se mencionó, los LPGs pueden alterar la estructura de las

balsas lipídicas del fagosoma; estas, además de promover el acople de proteínas asociadas con la maduración del fagolisosoma, también son importantes para el anclaje de MHC-II, por lo que su alteración podría afectar la incorporación de los MHC-II y de esta forma la presentación antigénica.(Gupta et al., 2013; Lodge & Descoteaux, 2004). Adicionalmente, algunos estudios revelan que *Leishmania* tiene la capacidad de reducir la expresión, a nivel transcripcional, del MHC-II (Bogdan & Rölinghoff, 1998). El segundo punto fundamental para la activación de linfocitos T, es la acción de moléculas co-estimuladoras; nuevamente se ha evidenciado que *Leishmania* puede inducir la regulación negativa de la expresión de algunos co-receptores fundamentales como lo son CD80 y CD86 en algunos modelos susceptibles a la infección (Gupta et al., 2013).

De esta forma, *Leishmania* tiene la capacidad de evadir, en algunos escenarios, la respuesta inmune desde varios frentes: (1) Inhibiendo su lisis en el fagolisosoma; (2) impidiendo el presentimiento antigénico y regulando negativamente co-receptores, lo que impide la formación de la sinapsis inmunológica y la activación de linfocitos T; (3) también altera, en modelos susceptibles, el perfil del citoquinas que modulan la respuesta Th1, la cual resulta efectiva para su eliminación, favoreciendo la respuesta Th2 que promueve su supervivencia; (4) induce una respuesta de tipo regulador, que incluye la activación de linfocitos Treg y Macrófagos M2, que inhibe la inflamación que promueve su eliminación, entre otros mecanismos.

4.2.2 Microambientes infecciosos y su implicación en la respuesta inmune

Dentro de la modulación de la respuesta inmune ante la infección con *Leishmania*, otros microorganismos también pueden acompañar la infección y tener efectos inmunomoduladores relevantes para ésta (Azambuja et al., 2005). Diferentes microorganismos habitan la piel de los vertebrados de forma natural, no patogénica. En algunos modelos experimentales, la disbiosis de dichos microorganismos o la infección experimental sobre modelos murinos libres de gérmenes (Germ-free), evidencian una mayor susceptibilidad ante la infección con *Leishmania*. Se han planteado algunas explicaciones plausibles a este efecto. Se ha evidenciado que la presencia de microorganismos en la piel puede modular la respuesta inmune ante la infección con *Leishmania*. Algunos autores reportan que la presencia de algunos de estos microorganismos, como *Straphylococcus*, pueden inducir una respuesta de tipo Th1/Th17 en la piel, que se especula puede ayudar a resolver la infección con *Leishmania*. Por otro lado, es bien sabido que algunos de estos microorganismos secretan péptidos antimicrobianos que podrían permitirles relacionarse de alguna forma con *Leishmania*; sin embargo, hacen indagar más esta área para generar conclusiones más acertadas (Misra & Singh, 2019). Otro grupo de microorganismos relevantes durante la infección con

Leishmania es la microbiota intestinal del vector. Algunos de estos microorganismos pueden inducir la producción de citoquinas reguladoras como IL-10, otros pueden inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , la cual recluta neutrófilos al sitio de infección; en cualquiera de estos casos, dichos microorganismos pueden promover la supervivencia y reproducción de *Leishmania* en el hospedero (Misra & Singh, 2019; Telleria et al., 2018).

Además de los microorganismos que pueden encontrarse en la piel del hospedero o en el intestino del vector y que, eventualmente, pueden acompañar la infección por *Leishmania*, se ha evidenciado la presencia de virus infectando estos parásitos, como el LRV1 ya mencionado. Varios estudios han relacionado la presencia de LRV1 con la complicación de la Leishmaniasis, asociando la presencia de éste en la cepa infecciosa con la posible evolución de LC a LM. Ives y colaboradores (2011) implicaron por primera vez a LRV1 en el desarrollo metastásico de la Leishmaniasis ocasionada por *Leishmania guyanensis*. Analizando el comportamiento de dos cepas de *L. guyanensis*, una metastásica (M+) y una no metastásica (M-), en modelos murinos, se evidenció una mayor producción de citoquinas proinflamatorias en aquellos individuos infectados con la cepa metastásica. Se planteó que la cepa M+ contenía alguna diferencia frente a la M- que inducía dicha respuesta inmune; se evaluó entonces la presencia de LRV1 en dicha cepa, teniendo en cuenta dos factores: (1) LRV1 es un virus que infecta parásitos del género *Leishmania* del nuevo mundo y que se sabe está presente en *L. guyanensis* (*L.g*) y (2) LRV1 es un virus de RNA de doble cadena, patrón molecular reconocido por TLR3, del cual se discutirá más adelante. Se encontró que la cepa M+, a diferencia de M-, contenía LRV1, lo cual permitió plantear que LRV1 podría estar implicado en el carácter metastásico de dicha cepa. Adicionalmente, se evaluó la respuesta inmune generada ante el RNA viral aislado, tanto en ratones Wild Type (WT) como en ratones carentes de TLR3 (TLR3^{-/-}), y se evidenció el mismo comportamiento previamente observado en la infección con M+ en WT y una disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias en TLR^{-/-}, dándole peso a la implicación de LRV1 en el carácter metastásico de dicha cepa e implicando a dicho receptor como mediador de la respuesta inmune para este caso (Ives et al., 2011).

También se ha evidenciado que la presencia de LRV1 puede modular la respuesta inmune del hospedero generando una respuesta inflamatoria de tipo Th17 que, a diferencia de la respuesta inflamatoria Th1 previamente discutida, promueve la virulencia del parásito (Hartley et al., 2016). La respuesta Th17 se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (Abbas et al., 2015), esto por supuesto puede favorecer la supervivencia del parásito ya que los neutrófilos, al ser células fagocíticas, proveen el entorno de replicación adecuado para el parásito: la vacuola parasitófora. Otro aspecto importante de la respuesta Th17 es que inhibe la producción de IFN- γ e

IL-4, bloqueando la diferenciación de CD4+ hacia un perfil Th1 y Th2, respectivamente (Abbas et al., 2015). Hartley y colaboradores (2016) encontraron, de forma consecuente con esto, una disminución en la producción de IFN- γ en ratones infectados con *L.g* LRV1+ y explican que esta podría ser una de las causas por las cuales la respuesta de tipo Th17 promueve la patogénesis, lo cual va en concordancia con las implicaciones de esta citoquina para la respuesta inmune ante *Leishmania*, recordemos que IFN- γ además de promover una respuesta Th1 promueve la maduración del fagolisosomas de macrófagos contenedores del parásito, induciendo su eliminación (Abbas et al., 2015; Agudelo & Robledo, 2000; Mougneau et al., 2011).

4.3 RECEPTORES TIPO TOLL (TLRS)

4.3.1 Generalidades de los TLRs

Los Toll-Like receptors (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrón (PRR) que, como su nombre lo indica, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAPMs) o a daño (DAMPs) para desencadenar una respuesta inmune ante estos. Dichos receptores son proteínas transmembranales de tipo I que, en su región extracelular o intraendosomal dependiendo de su localización, poseen entre 16 y 28 repeticiones ricas en leucina (LRR) que se encargan, justamente, del reconocimiento de patrones. En su región intracelular poseen un dominio Toll/IL-1 receptor (TIR), llamado así por su similitud con el dominio citoplasmático del receptor de IL-1; el dominio TIR es el encargado de disparar la cascada de señalización celular que tendrá como consecuencia la transcripción de mediadores de la respuesta inmune (Figura 3). Estos receptores carecen de la especificidad de otros receptores como los de células T (TCR) y B (BCR), pero reconocen un amplio rango de moléculas que pueden estar presentes en diferentes organismos patógenos con cierta especificidad, dependiendo del tipo de TLR. Estudios en humanos y ratones han permitido caracterizar once tipos de TLRs, alguno presentes en una u otra especie; estos se encuentran en su mayoría en la superficie celular de leucocitos, a excepción de los TLRs 3, 7, 8 y 9, que se localizan en compartimientos intracelulares (Abbas et al., 2015; Kindt et al., 2007) (Figura 4).

El dominio TIR de los TLRs usualmente está acompañado de moléculas adaptadoras MyD88, las cuales desencadenan la cascada de señalización que activa principalmente, más no únicamente, el factor de transcripción NF- κ B. Sin embargo, no todos los TLRs utilizan esta ruta de señalización, las rutas independientes de Myd88 pueden utilizar adaptadores como TRAM, TIRAP y TRIF (Kawai & Akira, 2007). La vía de señalización mediada por TRIF activa diversos factores de

transcripción como AP-1 y NF- κ B, factores de transcripción de citoquinas proinflamatorias, e IRF-3, que induce la transcripción de interferones (IFN) de tipo I (Kawai & Akira, 2007) (Figura 6).

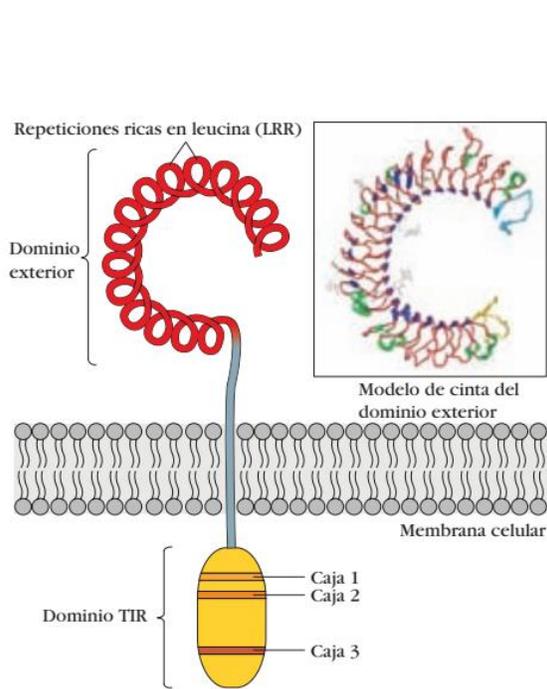


Figura 3 Estructura general de un receptor Toll-like. En rojo el ectodominio conformado por LRRs seguido por un dominio transmembranar que lo conecta con el dominio citosólico TIR, al cual se acoplan proteínas adaptadoras que desencadenan las cascadas de activación pertinentes tras la activación del receptor (imagen tomada de Kindt et al., 2007)

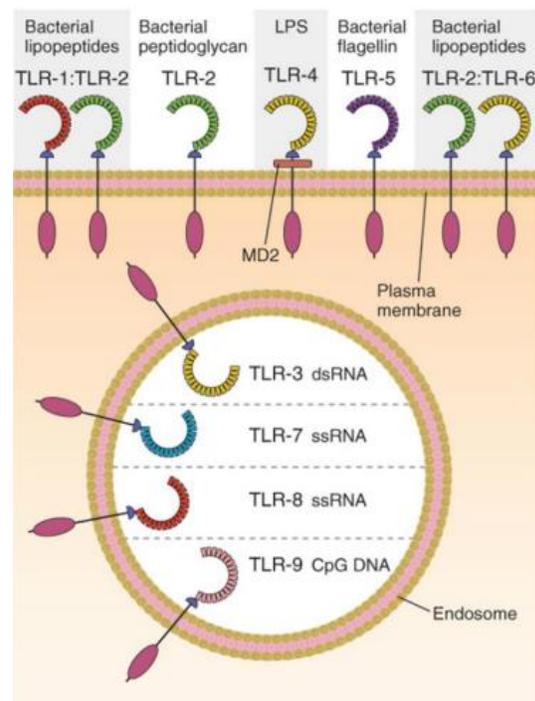


Figura 4 Localización y especificidad de los diferentes TLRs. TLR3 es un receptor endosomal que reconoce dsRNAs (imagen tomada de Abbas et al., 2015)

4.3.2 Caracterización de TLR3

El receptor endosomal TLR3, codificado por el gen TLR3, está ubicado en la banda 35, sub banda 1, del brazo largo del cromosoma 4 (4q35.1). (NCBI, 2020). Este gen tiene un tamaño de aproximadamente 16Kb, se compone por 5 exones que codifican para un mRNA de alrededor de 3Kb. El gen TLR3 codifica para una proteína de 904 aminoácidos, donde los primeros 24 aminoácidos conforman la secuencia señal que permite su síntesis en retículo endoplásmico (Figura 5). El ectodominio, o dominio intraendosomal, de TLR3 (Figura 5), abarca los primeros 670 aminoácidos de la proteína, después de la secuencia señal; se compone de 23 LRR, un cap N terminal y un cap C terminal, que protegen los extremos del ectodominio (Choe et al., 2005), y se caracteriza por tener una forma de herradura, donde la parte cóncava es hidrofóbica y está

compuesta por láminas β conectadas entre ellas por bucles irregulares (Bell et al., 2006). Este dominio del receptor posee cerca de quince (15) N-glicosilaciones tanto en su parte cóncava como en la zona convexa, pero mantiene una cara libre de glicosilaciones, se presume que puede ser ésta quien interactuó con su ligando, además de permitir la dimerización del receptor (Choe et al., 2005; Y. Wang et al., 2010). Entre estas glicosilaciones, se han evidenciado la presencia de N-acetil glucosaminas en diversos residuos de asparagina como: Asn²⁵², Asn²⁶⁵, Asn²⁷⁵, Asn²⁹¹, Asn³⁹⁸, Asn⁴¹³ y Asn⁵⁰⁷ (Choe et al., 2005). Este ectodominio se ancla a la membrana del endosoma mediante el dominio transmembrana del receptor que une el cap ce terminal del ectodominio y el dominio citosólico. Este dominio transmembrana se compone de una hélice alfa de cerca de 20 aminoácidos y se ha evidenciado que tiene la capacidad de homodimerizarse, por lo que se presume que puede tener relevancia durante la homodimerización que permite disparar la cascada de señalización de este receptor (Mineev et al., 2014). Finalmente, el dominio citosólico de TLR3, el dominio TIR, es una región de aproximadamente 200 aminoácidos que permite la interacción del receptor con proteínas adaptadoras que disparan la cascada de señalización. Este dominio TIR se compone de 5 láminas beta rodeadas por 6 hélices alfa y posee 3 regiones altamente conservadas, denominadas cajas (Figura 3), las cuales son fundamentales para las interacciones TIR-TIR que permiten el anclaje y activación del adaptador TRIF (Toll/interleukin 1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein inducing interferon- β) encargado de disparar la cascada de señalización (Güven-Maiorov et al., 2015; Kindt et al., 2007; Ullah et al., 2013).

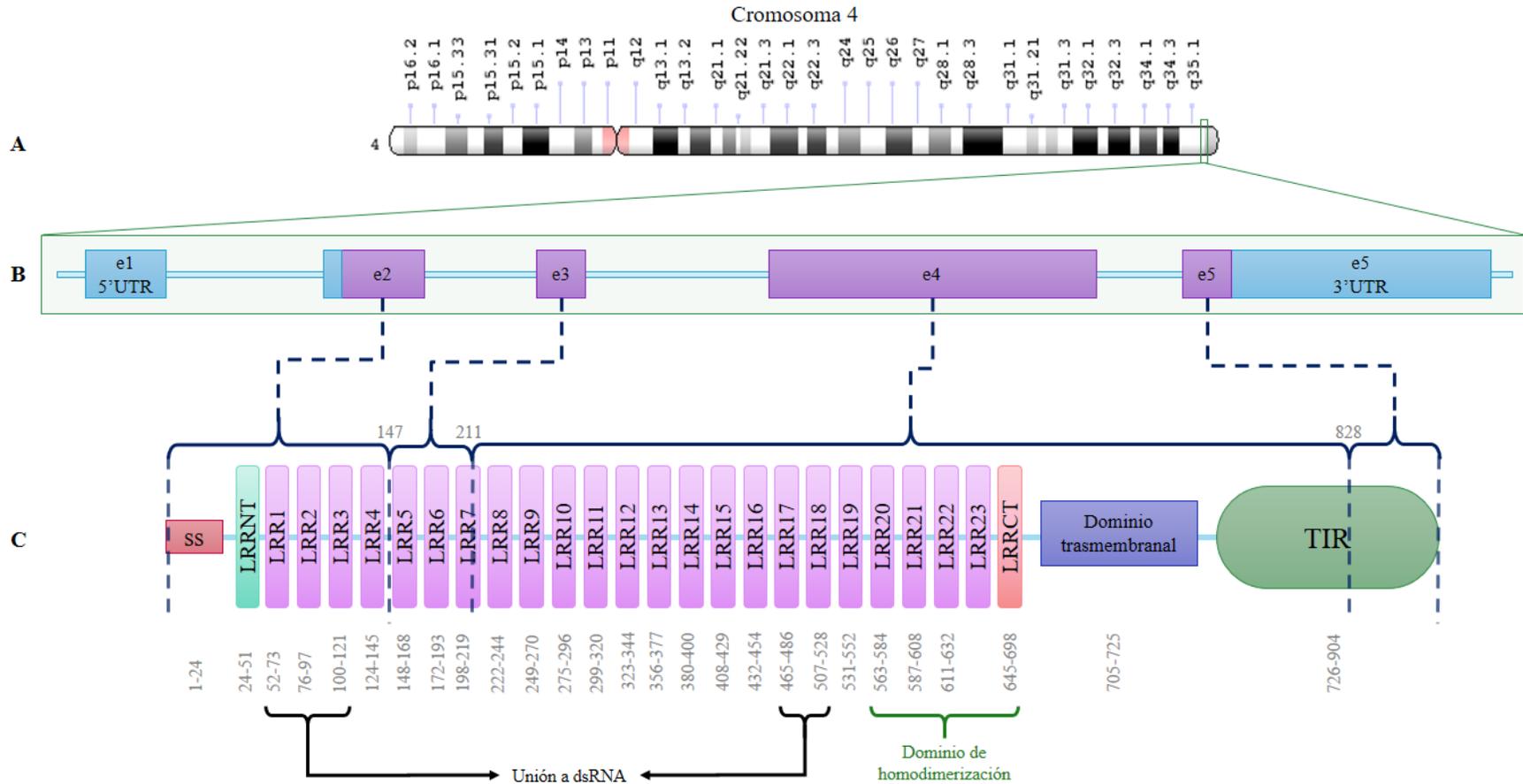


Figura 5. Localización y estructura general de TLR3. A) localización en cromosoma 4. B) esquema de estructura exónica del gen TLR3 y su correspondencia con la proteína (e1: exón 1, e2: exón 2, etc.). C) estructura de la proteína y dominios relevantes (ss: secuencia señal; LRR: Repetición rica en leucina; LRRNT: Repetición rica en leucina cap N-terminal; LRRCT: Repetición rica en leucina cap N-terminal; TIR: Dominio de homología del receptor Toll/Interleukin-1).

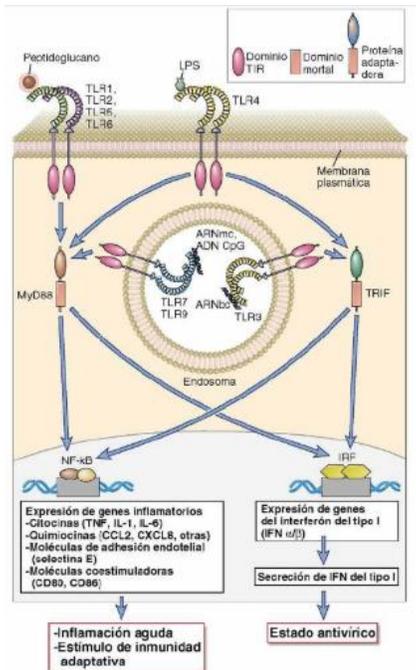


Figura 6 Vías de señalización de los TLRs. TLR3 activa la cascada de señalización independiente de MyD88, la cual está mediada por la proteína adaptadora TRIF que como desencadenante activa el factor de transcripción IRF3, principalmente, pero también puede llevar a la activación de NF-κB (imagen tomada de Abbas et al., 2015)

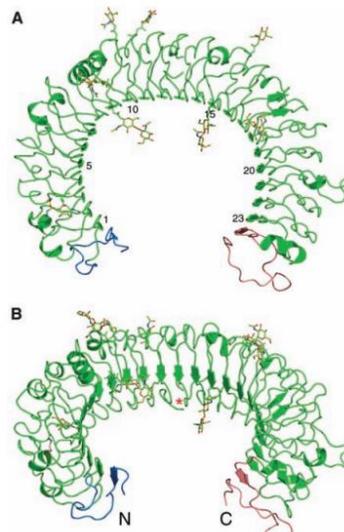


Figura 7 Estructura tridimensional del ectodominio de TLR3. Se evidencia la estructura en herradura, las β-láminas que componen la zona cóncava de este y las diferentes N-glicosilaciones (moléculas adyacentes a la estructura proteica). En azul se encuentra el extremo N terminal y el rosado el C terminal. A) Vista lateral, cara no glicosilada. B) Rotación a 45°C de la imagen A. (Imagen tomada de Choe et al., 2005)

Aún no es claro si tras el reconocimiento del dsRNA se induce una homodimerización de receptores, o si estos se encuentran dimerizados en condición normal y es esto lo que permite el acople del dsRNA (Choe et al., 2005); en cualquier caso, su homodimerización permite la activación de la cascadas de señalización intracelular que se genera tras su activación. El acople del dsRNA en el receptor induce un cambio conformacional en su región citosólica, lo que induce la liberación de un sitio de unión para la tirosin-quinasa EGFR. La unión de EGFR al receptor, a su vez, permite el reclutamiento de la tirosin-quinasa Src y dichas quinasas fosforilan el dominio TIR de TLR3, lo permite su interacción con el dominio TIR de la proteína adaptadora TRIF y será esta quien active la cascada de señalización subsiguiente tras su anclaje al receptor (Chattopadhyay & Sen, 2014).

Este receptor puede activar tres cascadas de señalización. La más común, o ruta canónica de TLR3, es la ruta de señalización que activa el factor de transcripción IRF3 (Figura 6). Esta cascada requiere

de la interacción de TRIF con TRAF3 (siglas en inglés para TNF receptor-associated factor) una ubiquitina que tras esta interacción se auto-ubiquitina y se activa lo que, a su vez, le permite interactuar con el complejo de serin-quinasas TBK1 - IKKi/IKKe, quienes se fosforilan de manera cruzada para activarse y fosforilar y activar a IRF3 (Interferon regulatory factor 3). Tras su fosforilación, IRF3 puede homodimerizarse o heterodimerizarse con IRF7 y, una vez esto sucede, migra al núcleo y fomenta la producción de IFNs de tipo I. Por otro lado, la proteína adaptadora TRIF también puede interactuar con TRAF6 quien actúa de forma similar a TRAF3 interactuando con las quinasas TAK1 y Rip-1. Dichas quinasas pueden activar dos cascadas de señalización no canónicas: (1) la ruta de las MAPK que conlleva a la activación de factores de transcripción como Jun y Fos, quienes en conjunto generan el factor de transcripción AP-1, y (2) la ruta NF- κ B, en la cual se requiere la fosforilación del inhibidor I κ B α a través de la quinasa NEMO para la liberación del factor de transcripción funcional (Abbas et al., 2015; Kawasaki & Kawai, 2014; Ullah et al., 2016). Estas últimas dos rutas tendrán como consecuencia la expresión de citoquinas proinflamatorias, por acción de NF- κ B, y de genes asociados a la regulación del ciclo celular, por acción de AP-1 (Abbas et al., 2015; Atsaves et al., 2019; Ye et al., 2014).

4.3.3 TLRs y LRV1 en el contexto de la infección por *Leishmania* spp.

Teniendo en cuenta el nicho que *Leishmania* spp. habita: la vacuola parasitófora, cabe esperar que dicho parásito u otros agentes coinfectantes, como LRV1, puedan ser reconocidos por TLRs endosomales. A la fecha no se conoce la implicación que podrían tener TLRs endosomales como TLR7 y TLR8, ambos de reconocimiento de RNA monocatenario (ssRNA). En cuanto a TLR9, el cual reconoce secuencias CpG en ADN, Ives et al. (2014) evaluaron la posible implicación de dicho receptor endosomal en el reconocimiento de LRV1 y *L. guyanensis* y encontraron que la carencia de este receptor inducía susceptibilidad a la infección por *L.g* en un modelo murino, por lo que propusieron que TLR9 podría conferir alguna protección en la infección con *L.g*; sin embargo, la implicación que tiene TLR9 en este sistema analizado, parece ser independiente de LRV1, ya que los efectos evidenciados no diferían entre una alta carga viral y una baja carga viral.

Actualmente el receptor endosomal TLR3 ha sido el único que se ha relacionado con el reconocimiento de LRV1. Ives et al. (2011) proponen que la interacción entre TLR3 y el genoma dsRNA de LRV1 y su posterior respuesta inmune, son los eventos causantes de la metástasis de las lesiones, lo que podría explicar el desarrollo de LM (Figura 8). Cómo interactúa el genoma del virus con el TLR3 aún no es claro; sin embargo, se ha evidenciado que LRV1 puede aprovechar la ruta secretora de *Leishmania* para salir del cuerpo celular de este y, mediante este mecanismo, podría entrar en contacto directo con la célula del hospedero humano en la cual está inmerso el parásito

(Atayde et al., 2019). Esto explicaría el mecanismo mediante el cual el virus entra en contacto con el hospedero, más no permite entender de qué forma el genoma del virus entra en contacto con TLR3, pero cabe esperar que el genoma viral sea de alguna forma liberado en el endosoma permitiendo su reconocimiento por TLR3.

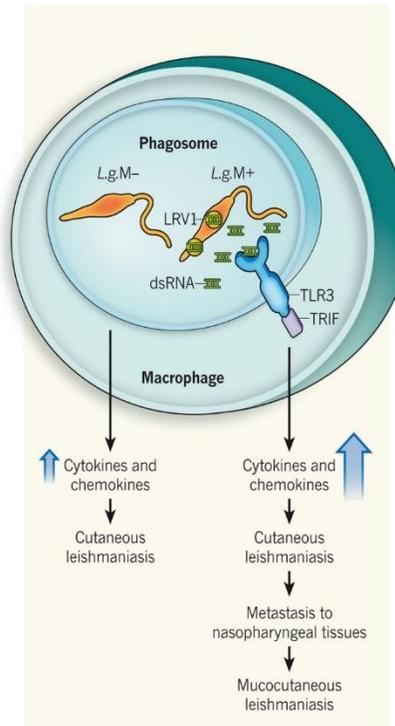


Figura 8 Modelo de interacción *L. guyanensis* – LRV1 – TLR3 propuesto por (Ives et al., 2011). (Imagen tomada de Olivier, 2011)

A partir de la implicación de TLR3 en el reconocimiento de LRV1, surge toda una línea de investigación en la cual se explora esta interacción en el desarrollo de complicaciones clínicas. Uno de los mecanismos que podría explicar el efecto generado por la presencia de LRV1 en cepas metastásicas frente al desarrollo clínico de la enfermedad, está dado por la expresión de IFN tipo 1 (α y β) tras la activación de TLR3. A partir de ensayos de infección experimental con *L. guyanensis* en un modelo murino, se evidenció que la presencia de LRV1 en la cepa infectante de *L.g* incrementaba el tamaño de las lesiones cutáneas producidas y la carga parasitaria, y que este efecto se veía abrogado en ratones carentes del receptor de IFN tipo I (*infa*^{-/-}). Se ha evidenciado que la expresión de IFNs tipo 1 limita el efecto generado por el IFN- γ dada una disminución en la expresión de su receptor, IFNGR, en la membrana de macrófagos (Eshleman et al., 2017; Rayamajhi et al., 2010); cabe recordar que la acción de IFN- γ , como ya se mencionó, es fundamental para una respuesta inmune eficiente ante *Leishmania* al favorecer un perfil inmune tipo

Th1 y la promoción de la capacidad lítica de macrófagos (Rossi & Fasel, 2018; Santos et al., 2019). En su estudio, Rossi et al. (2017) evidencian este efecto de los IFNs tipo 1 sobre IFNGR en el contexto de coinfección *L.g* – LRV1; como consecuencia, se evidenció una disminución en la acción de IFN- γ y, por consiguiente, la persistencia parasitaria que conllevó a la aparición de lesiones en zonas diferentes al sitio de inoculación de forma acelerada en ratones infectados con *L.g* LRV1+, desarrollo no observado en ratones *L.g* LRV1-. Este estudio concluye que la acción de los IFNs tipo 1, inducidos por la activación TLR3 tras el reconocimiento de LRV1, resulta un factor altamente incidente en el desarrollo metastásico de Leishmaniasis (Rossi et al., 2017).

Adicionalmente, se ha evidenciado que *L.g* promueve un cierto grado de fosforilación y activación de Akt, una serin/treonin quinasa que inhibe algunas proteínas pro-apoptóticas como BAD o Caspasa 9, además de activar factores de transcripción que promueven la transcripción de genes anti-apoptóticos (Song et al., 2005). Se ha observado que este efecto se ve acentuado en macrófagos de médula ósea ante la infección experimental con *L.g* LRV1+; esto permite suponer que la infección con *L.g* LRV1+ induce una mayor supervivencia de los macrófagos infectados (Eren et al., 2016). En este estudio se sugiere que la activación de Akt es, de alguna forma, aunque no únicamente, inducida por miR155, lo cual se logró concluir al evidenciar una reducción en la fosforilación de Akt en ratones miR155^{-/-}. Los micro RNAs, son moléculas reguladoras implicadas en diversos procesos como hematopoyesis, respuesta inmune y enfermedades neoplásicas, a partir de la regulación de la expresión génica (Faraoni et al., 2009). Se ha evidenciado que estas moléculas median algunas funciones en macrófagos y monocitos ante la estimulación de estos con IFN- β y ácido poliriboinosínico-polirribocitidílico (poly IC) (Faraoni et al., 2009), siendo este último un fuerte estimulador de TLR3 (Matsumoto & Seya, 2008). Dada esta relación de Akt con miR155^{-/-}, que es el único miRNA sobre expresado en macrófagos infectados con *L.g* LRV1+, y que además previamente ha sido relacionado con la activación de TLR3, se plantea que la supervivencia de macrófagos infectado por *L.g* LRV1+ puede estar mediada por la ruta de señalización TLR3/miR155/Akt (Eren et al., 2016).

Otro escenario en el que se ha visto implicado el receptor TLR3 como agente promotor de la supervivencia de *Leishmania*, es en la inhibición del inflamosoma. El inflamosoma es una estructura multiproteica ensamblada tras la activación del receptor citoplasmático de patrones moleculares Nod-Like Receptor (NLR). El reconocimiento de moléculas microbianas, como los LPG de membrana de *Leishmania*, induce la asociación de NLR con moléculas adaptadoras que, posteriormente, clivan pro-caspasa 1 convirtiéndola en su forma activa: caspasa 1, ésta, a su vez, se encarga de la activación de otras proteínas mediante el clivaje de su forma inactiva. Dentro de las

proteínas que pueden ser activadas a través de este mecanismo están: otras caspasas, las cuales inducen apoptosis, y citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 (Abbas et al., 2015). Se ha evidenciado que la activación del Inflamosoma puede ser favorable en el proceso de eliminación del parásito y que esta activación en efecto ocurre tras la infección con algunas especies y cepas de *Leishmania* (de Carvalho, Andrade, et al., 2019); sin embargo, ante la coinfección *L.g* LRV1+, la acción del inflamosoma disminuye considerablemente, lo que se puede ver tras la disminución en la producción de IL-1 β activa. Se propone que la inhibición del inflamosoma en el contexto de coinfección *L.g* LRV1+ está dada por autofagia de los componentes del complejo, así como de caspasa-11, activador no canónico del inflamosoma quien cumple un rol importante durante su activación tras el reconocimiento de LPGs de *Leishmania* (de Carvalho et al., 2021). Dicha autofagia se activa mediante la acción de IFN- β , cuya expresión se da tras el reconocimiento de LRV1 por TLR3 (de Carvalho, Lima-Junior, et al., 2019).

4.3.4 Polimorfismos de TLR3 y respuesta a virus

Como se ha venido discutiendo, TLR3 podría estar involucrado en la respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* spp. cuando el parásito está a su vez infectado con LRV1. La activación de este receptor de patrones moleculares se ha asociado con diversas rutas que conllevan al mismo desenlace: mayor supervivencia del parásito en el huésped y exacerbación de la enfermedad.

Algunas variaciones a nivel génico en este y otros PRR han sido asociadas con una mayor o menor susceptibilidad ante infecciones. El dominio LRR de los TLRs se encarga del reconocimiento de PAMPs mediante interacciones fisicoquímicas, por lo que la composición y conformación de este dominio es crucial para el correcto reconocimiento, su activación y posterior desencadenamiento de rutas de señalización que permitan efectuar una respuesta inmune. Para el caso de TLR4, se ha evidenciado que la presencia de determinados polimorfismos, que inducen un cambio en su estructura primaria, pueden conllevar a una disminución en la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo cual conllevaría a su vez a una alteración en la respuesta inmune inducida por citoquinas proinflamatorias cuya expresión depende de dicho factor (Arbour et al., 2000).

Para el caso de TLR3, algunos análisis poblacionales han evidenciado cerca de 90 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) siendo de gran interés aquellos que representan mutaciones no sinónimas. El SNP C1234T (rs3775291) induce la sustitución de la Leucina 412 por Fenilalanina (L412F), una de las sustituciones más ampliamente representadas a nivel poblacional para este receptor; se ha observado la presencia de este alelo en cerca del 28% de la población mundial (Phan et al., 2020); esta sustitución se lleva a cabo en la zona central cóncava del ectodominio e induce

una ligera modificación estructural en esta zona que puede afectar las interacciones hidrofóbicas de este dominio y las glicosilaciones presentes en la Asp⁴¹³, lo cual podría resultar en una disminución en su capacidad de unión a ligando y en una disminución de la activación de factores de transcripción como NF-κB (Gorbea et al., 2010; Ranjith-Kumar et al., 2007; Zhou et al., 2011).

Varios estudios relacionados con el rol del SNP rs3775291 en el desarrollo de diversas infecciones virales se han efectuado. Se ha evidenciado que la presencia del alelo T, quien induce el cambio de Leucina por Fenilalanina, puede estar relacionado con una mayor susceptibilidad ante la infección con citomegalovirus (Studzińska et al., 2017), Hepatitis B y C (Geng et al., 2016) y Herpes virus tipo 1 (Yang et al., 2012), frente a esta última se propone que la relación entre el polimorfismo y la susceptibilidad a Herpes virus 1 podría estar dada por una alteración en la producción de INF-γ por las células NKs. Adicionalmente, se ha evidenciado que la sustitución L412F podría relacionarse con el desarrollo del síndrome congénito de Zika (Santos et al., 2019).

Rs3775291, sin embargo, no está asociado únicamente a susceptibilidad. En infecciones por Dengue (Alagarasu et al., 2015), Herpes virus tipo 2 (Svensson et al., 2012) y VIH (Sironi et al., 2012) se ha evidenciado que la presencia del alelo T y, por tanto, la presencia de Fenilalanina en la posición 412 del receptor, están asociados a menor riesgo de incidencia de la infección. De esta forma, se puede evidenciar que las variaciones en el receptor no necesariamente tienen un efecto adverso en la respuesta inmune frente a una infección, sino que dependerá del contexto, del tipo de infección y las implicaciones que tenga la respuesta inmune disparada por TLR3 ante esta.

Otro polimorfismo que ha sido ampliamente estudiado en el contexto de infecciones es rs3775290, el cual se presenta como la sustitución C→A o C→T en la posición 1377 del gen TLR3. El codón en el cual se encuentra este polimorfismo codifica para una fenilalanina en la posición 459 del receptor, la cual es sustituida por Leucina ante la presencia del alelo A; el alelo T, por otro lado, es una mutación sinónima. La presencia del alelo C en este receptor ha sido asociada a la aparición de sintomatologías como fiebre y dolor articular en el contexto de infección por Chikungunya (Dutta & Tripathi, 2017); el alelo C también ha sido asociado a una mayor susceptibilidad ante la infección por Dengue (Saikat Mukherjee & Tripathi, 2019) y Hepatitis C (El-Bendary et al., 2018; Mosaad et al., 2019); mientras que el alelo T se ha asociado a la susceptibilidad ante el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (Engin et al., 2016).

También se ha evidenciado que la sustitución de la Asparagina 384 por Isoleucina (N284I), es asimismo relevante para la adecuada conformación estructural de TLR3. Esta mutación también ocurre en la zona cóncava del dominio LRR, más cercana al N terminal que la mutación L412F;

esta Asp genera diversos puentes de H con aminoácidos aledaños, por lo que esta sustitución puede conllevar a una desestabilización de la molécula en esta zona (Alipoor et al., 2016; Ranjith-Kumar et al., 2007).

Otras mutaciones del receptor TLR3 se han evaluado en menor medida. P554S, ha sido asociada con susceptibilidad a HVS (Qi et al., 2010); F303S podría favorecer la replicación de Influenza Virus A (Hidaka et al., 2006); Y307D y S737T, se han reportado, pero no parecen afectar la señalización inducida por Poly:IC en un modelo *in vitro*, como si sucede con mutaciones como L412F y N284I (Ranjith-Kumar et al., 2007). En general, existe una gran variedad de polimorfismos en el Toll-like receptor 3 que se ha visto modulan su acción frente a diversos agentes infecciosos y que, de igual forma, podrían alterar el reconocimiento que genera este receptor por LRV1, lo cual podría incidir en la progresión de la Leishmaniasis cuando se presenta dicho factor de virulencia.

5 METODOLOGÍA

5.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de ética de investigación de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, mediante el acta de evaluación: n°. 012-111 del 14 de agosto de 2020, y por el comité de ética de investigación del centro dermatológico Federico Lleras Acosta, mediante la comunicación interna No. 202002030039333 del 28 de septiembre de 2020. Adicionalmente, este hace parte del proyecto marco titulado: "Determinación de la asociación entre la presencia de Leishmaniavirus 1 (LRV-1) y el desarrollo de leishmaniasis mucosa en Colombia" avalado por Colciencias con código 110177758491.

La utilización en investigación de muestras clínicas y sus derivados, provenientes de seres humanos, se efectuó siguiendo las consideraciones de la Declaración de Helsinki y los lineamientos de la normatividad colombiana expuestos en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, por la cual "se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud".

Los ácidos nucleicos incluidos en este estudio fueron obtenidos a partir de muestras clínicas que hacen parte de los biobancos del Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta y del laboratorio de parasitología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Para el manejo de estas muestras, se hizo uso de los consentimientos informados con los que cuenta el biobanco (Anexo X); en estos, el paciente autoriza la preservación de las muestras en los mencionados biobancos y su uso en investigación. Este estudio, garantiza el anonimato y la confidencialidad de la información personal de los pacientes.

5.2 TIPO DE ESTUDIO, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DEFINICIÓN DE VARIABLES

La presente investigación es un estudio de asociación genotípica, definido como un estudio descriptivo, retrospectivo de casos y controles.

Se evaluaron las historias clínicas de pacientes diagnosticados con de LM entre el 2007 y el 2017. Se tomaron como criterios de inclusión para el grupo de casos:

- Que fuese una muestra (biopsia) perteneciente a un paciente con diagnóstico de LM o sospecha clínica de LM (signos y síntomas reportados)

- Cuyos hallazgos histopatológicos fuesen sugestivos o concluyentes de LM
- Y que tras el análisis molecular se confirmara mediante RT-qPCR la presencia de *Leishmania* spp.

Adicionalmente, se analizó en las historias clínicas que dichos pacientes tuviesen: un test terapéutico que indique una mejora clínica con el tratamiento, un test de Montenegro positivo, la presencia o ausencia de cicatriz sugestiva de LC y los antecedentes epidemiológicos, es decir si el paciente visitó o vive en áreas endémicas (Ovalle-Bracho et al., 2016).

En cuanto a los controles se evaluaron historias clínicas de pacientes diagnosticados con de LC entre 1997 y 2010, y se toman como criterios de inclusión:

- Que fuese una muestra (biopsia) perteneciente a un paciente con diagnóstico de LC
- Carecer de cualquier síntoma que pudiese sugerir LM al momento de su reclutamiento para su participación en el proyecto marco "Determinación de la asociación entre la presencia de Leishmanivirus 1 (LRV-1) y el desarrollo de LM en Colombia" o cuya historia clínica no presente reportes que sugieran LM. Frene a esto, cabe resaltar que se tomaron pacientes cuyo diagnóstico fue efectuado antes de 2010, de forma tal que al momento de inclusión en el estudio se contaba con una ventana temporal en la cual se pudo desarrollar LM, más no ocurrió.
- Y que tras el análisis molecular se confirmara mediante RT-qPCR la presencia de *Leishmania* spp.

Como ya se mencionó, tanto para casos como para controles resultó imperativa la confirmación de la presencia de *Leishmania* spp. en las muestras. Esto se efectuó mediante la amplificación por RT-qPCR (*quantitative reverse transcription Polymerase chain reaction*) del gen *18S* del parásito en RNA; en caso tal de no obtener amplificación positiva de dicho gen en RNA, se procedía a efectuar una qPCR sobre el DNA con el fin de obtener la confirmación requerida para la inclusión. Este procedimiento se efectuó de acuerdo al protocolo presentado por Parra-Muñoz y colaboradores (2021). Tras la confirmación de la presencia del parásito en la muestra, se efectuó una tipificación de la especie infectante mediante una PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) del gen *hsp70* siguiendo los protocolos reportados por Cruz-Barrera et al. (2015) para la identificación de especie de parásito en biopsias, como es el caso de las muestras aquí trabajadas; también se implementó el protocolo de amplificación para el gen miniexón de *Leishmania* de acuerdo al protocolo de Ovalle-Bracho y colaboradores (2018).

Este estudio manejó como variables dependientes las variables categóricas dicotómicas: desarrollo de LM en contexto de infección por *Leishmania* spp y desarrollo de LM en el contexto de coinfección *Leishmania* spp - LRV1. Para esta última, se requirió la determinación de la presencia de LRV1 en las muestras incluidas en el proyecto; para ello se amplificó mediante RT-qPCR el ORF1 de LRV1 (Fredy A. Pazmiño et al., 2021)

Las variables explicativas, o independientes, manejadas, fueron los alelos y genotipos de cada SNP de TLR3 encontrados; cabe aclarar que para este estudio no se focalizó la atención en ningún SNP puntual previamente reportado en literatura, sino que se genotipificó la región exónica del gen y se analizaron los SNPs evidenciados tras este análisis. Tanto alelos como genotipos se constituyen como variables categóricas e independientes entre ellas. Adicionalmente, se incluyeron otras variables relevantes para entender la dinámica poblacional, además de variables que pueden estar asociadas con el desarrollo de la enfermedad, como lo son: sexo, edad a la hora de adquirir LC, tratamiento, tipo de tratamiento, falla terapéutica y procedencia geográfica. Cabe aclarar que la variable “falla terapéutica” se entiende como la no evidencia de mejora en la lesión cutánea, luego de 6 semanas después del inicio del tratamiento, y que se considera que la lesión se encuentra en proceso de curación, cuando: hay un aplanamiento del borde de la úlcera, disminución de esta en un 50% o una cicatrización completa de la misma y, adicionalmente, disminuye o desaparece la inflamación de vasos linfáticos (Aronson et al., 2017; Rodríguez et al., 2016). Las variables analizadas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de variables analizadas en este estudio

Variable	Definición operativa	Tipo de variable	Categorías de la variable
Presentación clínica	Pacientes diagnosticados con LM o LC de acuerdo a criterios de inclusión establecidos	Variable dependiente, nominal dicotómica	LM: Diagnostico de LM (Caso) LC: Diagnostico de LC (Control)
Sexo	Sexo expresado por el paciente y registrado en la historia clínica	Variable independiente, nominal, dicotómica	Femenino Masculino
Edad	Edad en años a la hora de obtener diagnóstico de LC	Variable independiente, discreta	
Tratamiento	Recibió o no tratamiento para LC	Variable independiente, nominal, dicotómica	Si No
Tipo de tratamiento	Tipo de tratamiento para LC recibido	Variable independiente, nominal, politómica	Antimonio de meglumina Miltefosina Ketoconazol
Falla terapéutica	Desenlace clínico después del tratamiento	Variable independiente, nominal, politómica	Si (hubo falla terapéutica) No (Curación de la lesión)
Especie infectante de <i>Leishmania</i>	Tipificación de especie obtenida por diagnóstico molecular	Variable independiente, nominal, politómica	<i>Leishmania</i> spp. (No fue posible tipificar a nivel de especie, se caracteriza a nivel de género) <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i>
Presencia LRV1	Detección por RT-qPCR de <i>Leishmania</i> RNA Virus 1	Variable independiente, nominal, dicotómica	LRV1+ (<i>Virus</i> presente) LRV1- (<i>Virus</i> ausente)

5.3 TAMAÑO Y CÁLCULO DE LA MUESTRA

Se implementaron en este estudio muestras clínicas de pacientes colombianos con diagnóstico de LC y LM, provenientes del Centro dermatológico Federico Lleras Acosta (CDFLA), y cuyo DNA genómico total ya había sido previamente extraído a partir de biopsias para su implementación en el proyecto marco. Se partió de 103 muestras provenientes de pacientes diagnosticados con LC y 51 de pacientes diagnosticados con LM, de las cuales se incluyeron 70 y 28 muestras respectivamente, tras la confirmación de la presencia de *Leishmania* spp. en ellas. Esto significó que en un principio se tuvo un porcentaje de pérdida del 29,1% en el grupo de controles y del 45,1% en el grupo de casos. Posteriormente, se evaluó que tan apropiado era el tamaño muestral disponible para el desarrollo del estudio, para ello se evaluaron varios supuestos del comportamiento de las frecuencias alélicas de TLR3 en otras poblaciones frente a desenlaces clínicos de otras infecciones, como lo es, el desarrollo de fiebre hemorrágica por virus dengue. Utilizando como supuesto las frecuencias alélicas reportadas por Alagarasu et al. (2015), en donde el 50,6% de los controles eran portadores del alelo menos frecuente, así como el 24,2% de los casos, se estipuló que la muestra de estudio necesaria para trabajar con un poder estadístico del 70%, si se obtenía un escenario similar en el presente estudio, era de 32 casos y 65 controles, tamaño muestral similar al cual se pudo tener acceso para el desarrollo de este proyecto.

Durante el desarrollo del proyecto, dificultades presentadas con algunas muestras a lo largo del proceso de amplificación y de secuenciación, indujeron un nuevo porcentaje de pérdidas. Para la detección del polimorfismo rs3775291, no fue posible caracterizar el 21,4% de los controles ni el 3,6% de los casos; para el polimorfismo rs3775290 se obtuvo una pérdida del 30% de los controles y del 14,3% de los casos; para el polimorfismo rs764010322 no fue posible caracterizar el 28,5% de los controles, así como el 28,5% de los casos; y finalmente, frente al polimorfismo rs3775296 se obtuvo una pérdida del 14,3% de los controles y del 25% de los casos. Teniendo en cuenta esto, el tamaño muestral se vio limitado por la disponibilidad de muestras que se poseía en el biobanco, por el cumplimiento o no de los criterios inclusión previamente presentados y por la calidad y cantidad de DNA disponible que permitieran la amplificación y genotipificación del gen en estudio.

5.4 GENOTIPIFICACIÓN GEN TLR3

Para la genotipificación del gen TLR3 de pacientes diagnosticados con LM y LC, se amplificó una parte mayoritaria de la región codificante de dicho gen mediante PCR convencional, los amplicones obtenidos se purificaron y se secuenciaron para la posterior identificación de SNPs.

Se implementaron 3 protocolos de PCR que permitieron amplificar los exones dos, tres y cuatro del gen TLR3 (Figura 9A). Para la amplificación de los exones dos y tres se implementaron premezclas a volumen final de 50µL que contenían 1X de Buffer HiFi, 3mM de MgCl₂, 250µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 0.5µM de cada primer (los primers utilizados y sus características se encuentran reseñados en la Tabla 2) y 1U de Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Para la amplificación del exón 4, se implementó una premezcla a volumen final de 20µL que contenía 1X de Buffer HiFi, 3mM de MgCl₂, 250µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 0.5µM de cada primer (de igual forma, los primers utilizados y sus características se encuentran reseñados en la Tabla 2), 5% de DMSO y 1U de Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Los programas de temperatura utilizados para estas amplificaciones se detallan en la Tabla 3).

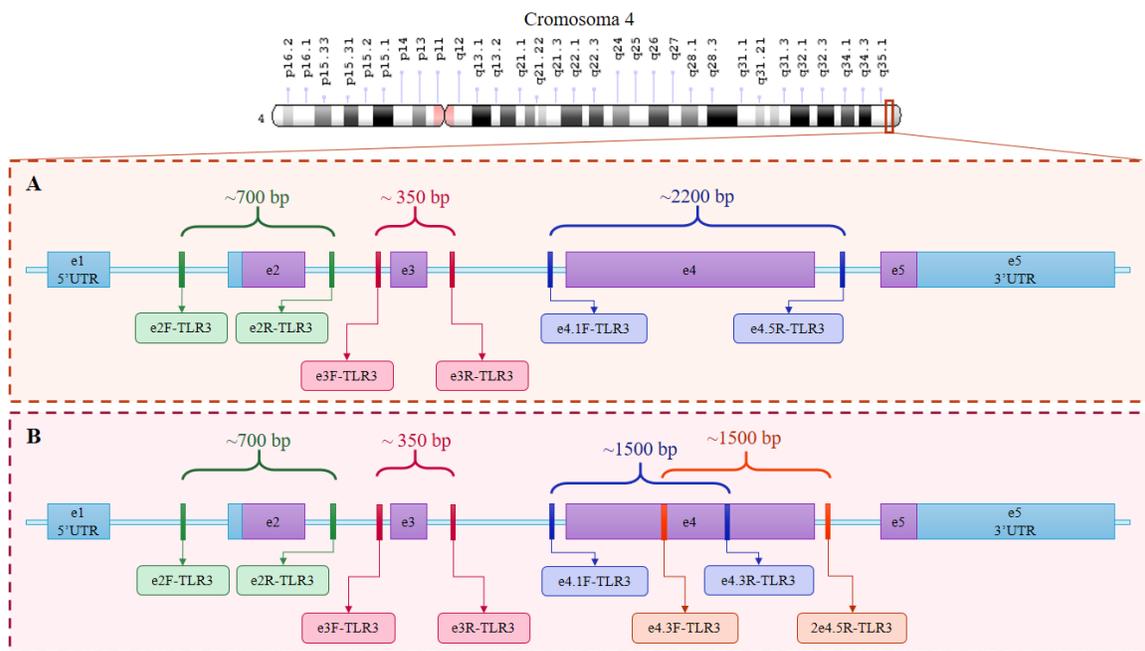


Figura 9. Diagrama de localización y estructura del gen TLR3, así como sitios de anillamiento de primers implementados en PCR (A) y secuenciación (B). En azul se denotan las regiones no codificantes del gen 5'UTR y 3'UTR, en morado las regiones codificantes.

Tabla 2. Primers usados en la amplificación por PCR y secuenciación de los exones dos, tres y cuatro del gen TLR3 (Deeba et al., 2019)

Exón	Nombre primer	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	GC%	Tamaño aproximado del amplicón
2	e2F-TLR3	F-GAATATACCAATGCATTTGAAAGC	58,4	33	700 bp
	e2R-TLR3	R-GGCAATATTTGTGGCAAATTG	55,5	38	
3	e3F-TLR3	F-ATAGAGAGGTTGATTTGCTG	59,3	39	350 bp
	e3R-TLR3	R-TGTGTATGTGACACAGATAGGGAC	63,5	46	
4	e4.1F-TLR3	F-GGCTTCAACAGCATTACAGAG	60,3	45	2000 bp
	e4.5R-TLR3	R-ATTCTTTGAGTTGTGAGTAATATTGG	60	31	
	e4.3R-TLR3 *	F-ATTGGGCAAGAACTCACAGG	62,5	40	
	e4.3F-TLR3 *	R-CCTGATTATTAAGACAGATGCTGG	58,4	50	
	2e4.5RF-TLR3 *	R-GCTGTCATAGGCTCAGTGGC			

* Primers implementados únicamente durante el proceso de secuenciación

Tabla 3. Programas y premezclas implementados para la amplificación de los exones 2, 3 y 4 de TLR3

Exón	Programa					Premezcla						
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización *	Anillamiento *	Extensión *	Extensión final	Buffer	MgCl2	dNTPs	Primers	Taq	DMSO	Templete
2	95°C 5min	95°C 45s	54°C 30s	72°C 45s	72°C 5min	1X	3mM	250µM	0,5µM	1U	No	18ng
3	95°C 5min	95°C 45s	55°C 30s	72°C 45s	72°C 5min	1X	3mM	250µM	0,5µM	1U	No	12g
4	95°C 5min	95°C 45s	56°C 30s	72°C 2min	72°C 10min	1X	3mM	250µM	0,5µM	1U	5%	12ng

* 35 ciclos de amplificación

Posterior a la obtención de amplicones de los exones dos y tres se efectuó una cromatografía en columna de Sephadex® G-50 (Cytiva) para la purificación de estos. Se rehidrató 1g de resina por cada 9mL de agua grado molecular durante 3h a 20°C, posteriormente se posicionó un tapón de tela quirúrgica en jeringas de insulina de 0,3mL, se introdujo la resina para la construcción de la columna y se efectuaron varios lavados de la misma con agua grado molecular. En paralelo, los amplicones se mezclaron con tres partes de Fenol, se centrifugaron a 10.000g por 3min y se rescató la fase acuosa que luego se agregó a la columna. Las columnas cargadas con muestra se acoplaron a tubos falcon de 15mL y se centrifugaron a 1000g por 4min; finalmente se recuperó el purificado. Para los amplicones del exón 4, se efectuó una purificación con Acetato de amonio. Se mezclaron los productos de PCR (20µL) con 2µL de Acetato de amonio 5M y dos volúmenes de Etanol absoluto frío, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se efectuaron dos lavados con 100µL de Etanol 70%. Finalmente se retiró el etanol haciendo uso de un concentrador de vacío y se resuspendió en 25µL de agua grado molecular. Finalmente, los purificados fueron cuantificados por nanodrop 2000 (Thermo Fisher) y visualizados por electroforesis en gel de agarosa.

Una vez obtenidos los purificados, se secuenciaron las muestras en ambas direcciones usando los primers ilustrados en la Figura 9B y reseñados Tabla 2. La secuenciación fue efectuada por

Macrogen (Seul, Korea) por medio de electroforesis en capilar usando un equipo ABI 3730xl. Para el análisis de electroferogramas se utilizó el software bioinformático UGENE (Okonechnikov et al., 2012) mediante el cual alinearon las secuencias obtenidas con sus respectivos electroferogramas frente a una secuencia de referencia (NC_000004.12:186069156-186088073 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly). Para el análisis de secuencias se efectuó un *trimming* automático con un umbral del 30%, luego se corroboró la calidad de los extremos y, de ser necesario, se efectuó un segundo *trimming* manual. Mediante dichos alineamientos, se rastreó la presencia de SNPs identificando la presencia de nucleótidos diferentes entre la secuencia de referencia y las secuencias obtenidas, constituyendo estos los homocigotos para el alelo raro, o a través del rastreo de ambigüedades o dobles picos sugerentes de heterocigotos (ver Anexo 2 – Identificación de SNPs en electroferogramas). Las variaciones encontradas se validaron con SNPs previamente reportados para TLR3 (Gene ID: 7098) en dbSNP (*data base of Single Nucleotide Polimorphisms*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), y se almacenó la información obtenida mediante la construcción de tablas en Excel (Microsoft Corporation, 2016).

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico, se construyeron mediante Excel (Microsoft Corporation, 2016) tablas de contingencia donde se resumió la distribución de frecuencias absolutas y relativas de casos (LM) y controles (LC) frente a variables independientes como: sexo, especie infectante de Leishmania, presencia LRV1, tipo de tratamiento para LC y falla terapéutica. Respecto a estas variables, se efectuó una comparación entre casos y controles implementando un test exacto de Fisher o una prueba χ^2 de Pearson, de acuerdo a su pertinencia. Posteriormente, se construyeron tablas de contingencia que expresan frecuencias absolutas y relativas de los alelos y genotipos evidenciados en el grupo de casos (LM) y en el de controles (LC) tanto para la totalidad de la muestra como para la muestra LRV1+. Se implementó un test exacto de Fisher para comparar la distribución de frecuencias alélicas en las diferentes regiones naturales de Colombia, de las cuales provenían los pacientes, y una prueba χ^2 de Pearson para evaluar el comportamiento de la distribución de alelos en la población de estudio frente a otras poblaciones reportadas a nivel mundial. Se evaluó de forma manual el equilibrio Hardy-Weinberg para cada uno de los SNPs encontrados sobre el grupo de controles con el fin de evidenciar si la población de estudio presentaba algún tipo de estratificación. A aquellos SNPs que no se encontraban en equilibrio no se les efectuaron los subsiguientes análisis de asociación, mientras que a aquellos que si se encontraban en equilibrio se les aplicó un test exacto de Fisher, para evaluar si existe alguna asociación entre la distribución de frecuencias de los SNPs encontrados y el desarrollo de LM. Para la aplicación de las pruebas χ^2 de Pearson y los test

exactos de Fisher se implementó el paquete R commander del software R (Fox & Bouchet-Valat, 2019) y se utilizó una significancia de 0,05. Finalmente se empleó el software GraphPad Prism versión 9.1.2 (Software MacKiev, 2021) para la construcción de gráficas.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para este estudio se contó con un total de 96 muestras de las cuales 28 (29,17%) correspondían a pacientes diagnosticados con LM, definidos como casos, y 68 (70,83%) a pacientes diagnosticados con LC, definidos como controles. Se contó con 9 (32,2%) pacientes femeninos y 19 (67,8%) masculinos en el grupo de casos y con 18 (26,5%) femeninos y 50 (73,5%) masculinos en el grupo de controles. Para los casos, el rango de edades al momento de adquirir LC es de entre 4 y 83 años (mediana=32, IQR=13) y para controles entre 10 y 62 años (mediana=23, IQR=18,25); sin presentar diferencias entre casos y controles para la variable sexo ($p=0,574$, prueba χ^2 de Pearson, Tabla 4) ni para la variable edad ($p=0,116$, test de rangos de Wilcoxon, Figura 10).

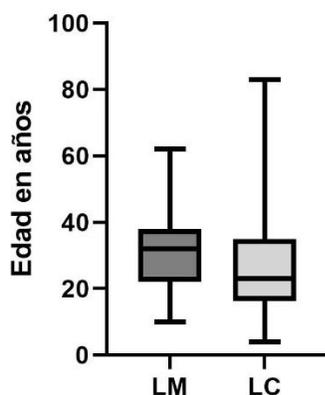


Figura 10. Distribución de edad a la hora de adquirir LC en casos (LM) y controles (LC). El grupo LM tiene una mediana=32 (IQR=13) y el grupo de LC tiene una mediana=23 (IQR=18,25), no se evidencia ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p>0,005$)

A todas las muestras incluidas en el estudio se les confirmó la presencia de *Leishmania* spp. mediante la amplificación por RT-qPCR o qPCR del gen 18S del parásito. Adicionalmente, se efectuó una tipificación de especie de *Leishmania* infectante mediante una PCR-RFLP del gen *hsp70*. Tras la tipificación se encontró que 37 (55,22%) controles y 19 (67,86%) casos se encontraban infectados con *L. braziliensis*, 11 (16,42%) controles y 5 (17,86%) casos con *L. panamensis*, 1 (1,49%) control y 1 (3,57%) caso con *L. guyanensis*, y en 18 (26,87%) controles y 3 (10,71%) casos no fue posible identificar la especie de *Leishmania*. En cuanto a la variable especie de *Leishmania*, la frecuencia de distribución de estas no presenta diferencia entre casos y controles ($p=0,2883$, test exacto de Fisher, Tabla 4). Posteriormente se efectuó la identificación de LRV1 en las muestras, mediante la amplificación por RT-qPCR el ORF1, y se encontró que 10 casos y 5

controles presentaban el virus, lo que correspondía a un 35,71% y 7,35% de cada grupo, respectivamente. Para esta variable si se encontró una diferencia significativa entre grupos ($p=0,0012$, Tabla 4), tras efectuar un test exacto de Fisher, y se evidenció un OR crudo de 6,824 (IC95%: 1,847 – 28,933) que indica un riesgo de adquirir LM casi 7 veces mayor si se presenta la confección con LRV1 frente a si no se presenta.

Todos los controles recibieron tratamiento para LC. Por otro lado, el grupo de casos presentó 9 (32%) pacientes que no recibieron ningún tratamiento, ya sea porque no tuvieron la oportunidad o porque no tuvieron una lesión cutánea previa a la LM, frente a 19 (68%) que si lo recibieron. Tras comparar ambos grupos, existe una diferencia significativa entre casos y controles para esta variable, dado que todo paciente carente de tratamiento se ubica en el grupo de casos ($p<0,0001$, test exacto de Fisher, Tabla 4). En cuanto al tipo de tratamiento, para aquellos que sí lo recibieron, en el grupo de controles, 64 (96,97%) pacientes fueron tratados con antimoniato de meglumina y 2 (3,03%) fueron tratados con ketoconazol; por otro lado, en el grupo de casos 7 (25%) fueron tratado con antimoniato de meglumina, un paciente (3,57%) fue tratado con ketoconazol y otro (3,57%) con miltefosina. Ambos grupos son comparables en cuanto al tipo de tratamiento recibido ($p=0,072$, test exacto de Fisher, Tabla 4), siendo el antimoniato de meglumina el tratamiento más frecuente en ambos.

De los pacientes tratados, varios presentaron falla en terapéutica. Ante el tratamiento con antimoniato de meglumina el 30,65% de los controles tratados con este medicamento presentaron falla terapéutica, mientras que la totalidad de los casos curaron la lesión cutánea tras el tratamiento; para el tratamiento con ketoconazol, 3 pacientes fueron tratados y dos de ellos lograron curar la lesión, un caso y un control, mientras que el tercero, un control, presentó falla terapéutica. Finalmente, el paciente con LM tratado con miltefosina presentó falla terapéutica. Una comparación entre casos y controles para falla terapéutica, sin discriminar por tipo de tratamiento, no evidenció ninguna diferencia en el comportamiento de los casos frente a los controles ($p =0,432$, test de Fisher, Tabla 4).

Tabla 4. Resumen y comparación de características clínicas y epidemiológicas entre los grupos de pacientes

diagnosticados con LM (casos) y con LC (Controles)

Variable	Categoría	LC		LM		P-value
		Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	
Sexo	Femenino	18	0,26	9	0,32	0,574*
	Masculino	50	0,74	19	0,68	
Especie infectante de <i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i> spp.	19	0,28	3	0,11	0,253
	<i>L. braziliensis</i>	37	0,54	19	0,68	
	<i>L. panamensis</i>	11	0,16	5	0,18	
	<i>L. guyanensis</i>	1	0,01	1	0,04	
Presencia LRV1	Si	5	0,07	10	0,36	0,0012
	No	63	0,93	18	0,64	
Tratamiento para LC	Si	66	1	9	0,32	< 0,0001
	No	0	0	19	0,68	
Tipo de tratamiento para LC	Antimonio de meglumina	62	0,91	7	0,25	0,072
	Miltefosina	0	0,00	1	0,04	
	Ketoconazol	2	0,03	1	0,04	
Falla terapéutica	Si	20	0,29	1	0,04	0,432
	No	44	0,65	8	0,29	

Valores P obtenidos a mediante Test exacto de Fisher, * denota valores p obtenidos mediante prueba χ^2 de Pearson
Análisis estadísticos detallados en Anexo 1 – Análisis estadísticos: Caracterización de la población de estudio

6.2 EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE PCR, PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE SECUENCIAS DE TLR3

El diseño metodológico planeado inicialmente para la genotipificación del gen *TLR3* en muestra clínicas, planteaba la amplificación de los 5 exones que componen el gen y su posterior purificación y secuenciación. Para la amplificación, se partió del protocolo establecido por Deeba y colaboradores (2019) en dónde se efectúa una PCR por cada uno de los exones: uno, dos, tres y cinco, y cinco PCRs para la amplificación del exón 4, para un total de nueve procedimientos de PCR por muestra. Para el proceso de estandarización se contó con muestras diferentes a las muestras a analizar en el proyecto, se utilizaron DNAs extraídos de sangre periférica de donantes y DNAs extraídos de biopsias e hisopados pertenecientes a otros proyectos; estos últimos implementados para la corroboración de la eficiencia de los protocolo estandarizados sobre DNA de sangre periférica, pero en este tipo de muestras que pueden llegar a ser problemáticas dada la presencia de inhibidores y la calidad variable el DNA en algunos casos.

Para el proceso de estandarización de los protocolos de PCR, se partió de las condiciones de premezcla y programas de temperaturas propuestos por Deeba et al. (2019) y se modificaron condiciones como concentración de $MgCl_2$, temperatura de anillamiento y se determinó la cantidad mínima de templete requerida para la amplificación efectiva. Estos procedimientos se desarrollaron inicialmente con una *Taq* DNA polimerasa recombinante (invitrogen) en conjunto con Buffer KCl y $(NH_4)_2SO_4$ y posteriormente se efectuaron ensayos finales con la Platinum™ *Taq* DNA Polymerase

High Fidelity (Invitrogen) y su respectivo Buffer. En algunos casos se evidenció que el buffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resultaba más apropiado para la amplificación específica de los fragmentos que el buffer KCl; sin embargo, también resultó evidente que la implementación de la Platinum™ Taq con su respectivo buffer, optimizado para el funcionamiento de la misma, fue bastante más favorable para la amplificación, lo cual se evidenció tanto en la especificidad de las bandas obtenidas como en la robustez de la mismas tras la electroforesis en gel de agarosa (ver Figura 11). Partiendo de esto, se estableció como buffer a implementar en la amplificación de muestras clínicas, el buffer HiFi en conjunto con la Platinum™ Taq HiFi.

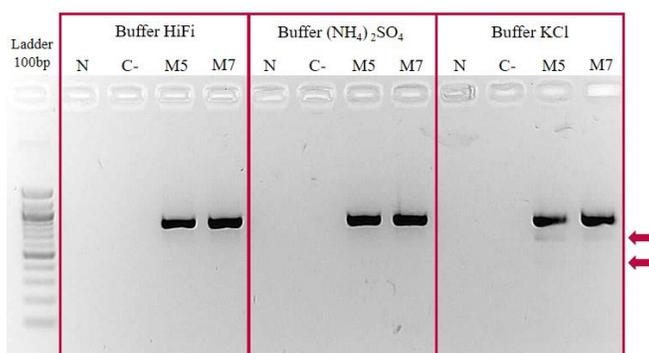


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Comparación de la amplificación de un fragmento problemático de 800bp utilizando Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) en conjunto con su respectivo Buffer HiFi, buffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y buffer KCl. Flechas rojas señalan bandas inespecíficas sobre 600bp y 400bp. N: Control negativo de premezcla; C-: control negativo de zona de servida; M5 y M7: muestras problema; Ladder 100bp: Marcador de peso molecular ZR 100 bp DNA Marker™.

Tras la estandarización de las cinco PCRs que permitirían la obtención del exón 4 de *TLR3*, se evidenció que la implementación de esta aproximación metodológica resultaba muy dispendiosa y requería de una gran cantidad de insumos que podrían ser optimizados tras un reajuste del protocolo. Con la intención de optimizar procesos y reactivos para procesamiento de muestras clínicas, se probó la amplificación de la totalidad del exón en un solo procedimiento de PCR. Para esto, se utilizó una pareja de primers que combinaba el primer forward del primer fragmento de las cinco iniciales y el primer reverse del quinto fragmento; adicionalmente se utilizó un programa de temperaturas similar a los utilizados para la amplificación de los fragmentos pequeños, pero se ajustó la temperatura de anillamiento a una temperatura favorable para esta pareja de primers. Un primer ensayo realizado, evidenció una amplificación mínima del exón, por lo que en ensayos posteriores se tomaron dos medidas para optimizar esta amplificación: (1) se incrementó el tiempo de extensión del programa de temperatura, para favorecer la acción de la DNA polimerasa y (2) se hizo uso de un enhancer de PCR (Dimetilsulfóxido, DMSO) que estabilizara la apertura de la cadena de DNA, permitiendo a la polimerasa copiar el fragmento de gran tamaño (aproximadamente 2200bp) (ver Figura 12).



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Comparación de la amplificación del exón 4 (2200bp) en diferentes condiciones frente al uso de DMSO 5% y Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), tras el incremento del tiempo de extensión. N: Control negativo de premezcla; C-: control negativo de zona de servida; M2: muestra problema; 1Kb: Marcador de peso molecular ZR 1 kb DNA Marker™

Tras la estandarización de procesos de amplificación de los exones de TLR3, se secuenciaron los productos obtenidos de dichos procesos. Para ello, se estandarizó un protocolo de purificación por cromatografía en columna de Sephadex® G-50 (Cytiva). Se testeó este protocolo para la purificación de fragmentos de entre 400bp y 2200bp y se evidenció (1) una buena efectividad del protocolo, dada por la disminución de dímeros de primers evidenciados en electroforesis en gel de agarosa y por la calidad de las secuencias obtenidas, y (2) una buena eficiencia del mismo, evidenciada mediante la robustez de las bandas observadas por electroforesis en gel de agarosa y por su cuantificación con nanodrop.

Este protocolo de purificación se implementó para el análisis de amplicones obtenidos durante la estandarización y para la obtención de resultados correspondientes a los exones 2 y 3; sin embargo, las purificaciones de muestras clínicas de dichos exones evidenciaron nuevamente la necesidad de optimizar procesos, ya que la preparación de columnas de Sephadex y el procedimiento de purificación subsiguiente requiere de bastante tiempo, lo cual no resulta apropiado para el procesamiento de grandes volúmenes de muestras. Por consiguiente, se efectuó una aproximación a la purificación del exón 4 por medio de precipitación salina con acetato de amonio 5M. Al comparar los purificados obtenidos mediante purificación con Sephadex contra los resultados de la precipitación salina, se evidenció que este último protocolo tenía una efectividad similar, aunque una menor eficiencia; sin embargo, las cantidades de amplicón obtenidas mediante precipitación salina fueron suficientes para el proceso de secuenciación del exón 4 y dicho procedimiento contaba con la ventaja de una menor duración, lo que permitió una optimización del proceso de purificación.

Para cada uno de los exones analizados se efectuaron ensayos previos de secuenciación y análisis de secuencias. Se tomó el servicio de secuenciación por electroforesis capilar de MacroGen (Seul, Korea) y para la mayoría de los amplicones secuenciados se obtuvieron secuencias limpias, concordantes con la secuencia de referencia y con una buena cobertura (igual o cercana al 100% de cada exón). El exón 4 fue la única excepción, ya que presentó dos inconvenientes durante las primeras aproximaciones al secuenciamiento. El primer inconveniente que se registró fue la obtención de secuencias reverse de baja calidad, secuencias con picos mezclados y gran cantidad de ruido de fondo. Esto se debió a que el primer implementado anillaba en una zona rica en AT, lo que probablemente indujo una mala polimerización de esta zona durante el proceso de secuenciación. Ante esta situación, se implementó un primer alternativo, también reportado por Deeba et al. (2019) para este proceso. El segundo inconveniente evidenciado fue la poca cobertura de las secuencias obtenidas, la cual oscilaba entre el 40 y el 55% del exón; esto resultó problemático, ya que las secuencias forward y reverse no lograban alinearse entre sí, en algunos casos ni siquiera se sobrelapaban, y por tanto no se lograba la confirmación de secuencia que se esperaba al generar el secuenciamiento en ambas direcciones. Como solución a esta problemática, se efectuó un ensayo previo en el cual se partió del amplicón de 2,2Kb del exón 4 en su totalidad y se secuenció en dos fragmentos de aproximadamente 1,5Kb, lo que se logró mediante la combinación de dos parejas de primers de las PCR pequeñas inicialmente planteadas para la amplificación de este exón; se tomó el primer forward del primer fragmento del exón 4, en conjunto con el primer reverse del tercer fragmento, y el primer forward del tercer fragmento junto con el primer alternativo ya mencionado para la secuenciación reverse. Esta aproximación permitió la obtención de secuencias forward y reverse con una cobertura igual o muy cercana al 100% del exón.

6.3 AMPLIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN

Se implementaron 3 protocolos de PCR para la amplificación de los exones dos, tres y cuatro de TLR3. Se decidió no amplificar el exón uno al no ser región codificante (región 5'UTR), ni el exón 5 ya que no poseía mayores variaciones reportadas para población latinoamericana.

Se logró obtener amplificación de 91 muestras para el exón 2, las cuales fueron purificadas y secuenciadas. Tras la recepción de las secuencias se excluyeron algunas muestras dada la baja calidad de sus secuencias. En total, se analizaron 83 muestras, 23 casos y 60 controles, y se encontró la presencia de una variación C > A sobre el inicio del exón. Al contrastar esta información con la base de datos dbSNP de NCBI se identificó este polimorfismo como rs3775296

una variación sobre la región 5'UTR del gen (ver Figura 13). Se evidenció que la frecuencia de aparición del alelo A fue de 0,21 (Tabla 5).

Para el análisis del exón 3 de TLR3 se amplificaron y secuenciaron 55 muestras, 24 casos y 32 controles. Si bien en esta región se encuentran varios SNPs reportados, para Latinoamérica la frecuencia de los alelos dominantes de estos es de 1, lo que es consistente con la ausencia de variaciones evidenciadas en este estudio. Dado que en no se encontró ningún SNPs en este exón, y que los reportes de frecuencias alélicas para Latinoamérica no permiten pensar que un aumento del n permita encontrar alguna variación, se decidió no secuenciar dicha región en más muestras, lo que explica el bajo tamaño de muestra que aquí se tiene.

El exón 4 se amplificó en su totalidad (aprox 2200bp) utilizando la pareja de primers e4.1F-TLR3 y e4.5R-TLR3, pero se secuenció en dos fragmentos de aproximadamente 1500bp implementando dos parejas de primers: e4.1F-TLR3 y e4.3R-TLR3, para el primer fragmento, y e4.3F-TLR3 y 2e4.5R-TLR3, para el segundo fragmento (ver Tabla 2 y Figura 9). Tras el análisis de secuencias se evidenciaron tres variaciones sobre la primera mitad del exón la cuales se identificaron como: rs764010322 (A > G), rs3775291 (C > T) y rs3775290 (C > T) (ver Figura 13).

rs764010322 (A > G) es una variante sinónima, es decir que no genera un cambio de aminoácido en la proteína resultante; se evidenció una frecuencia de aparición del alelo G del 0,071 en la totalidad de la muestra analizada (Tabla 5). rs3775290 tiene dos posibles variaciones C > A, una variación no sinónima que induce el cambio del aminoácido 459 de Fenilalanina (Phe) a Leucina (Leu) en la proteína resultante, y C > T una variación sinónima; en este estudio únicamente se evidenció la variación sinónima C > T y el alelo menos frecuente T tuvo una frecuencia de aparición del 0,322 (Tabla 5). Finalmente, rs3775291 es un SNPs altamente estudiado en este gen debido a que el cambio C > T constituye una variación no sinónima L (Leu) > F (Phe) en el aminoácido 412 del receptor, dicho alelo T se evidenció con una frecuencia de 0,372 (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de frecuencias alélicas de los polimorfismos (SNPs) evidenciados en el gen TLR3 en la totalidad de la muestra.

SNPs	Locación	Alelo	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas
rs3775296	5'UTR	C	128	0,790
		A	34	0,210
rs764010322	Exón 4	A	130	0,929
		G	10	0,071
rs3775291	Exón 4	C	103	0,628
		T	61	0,372
rs3775290	Exón 4	C	99	0,678
		T	47	0,322

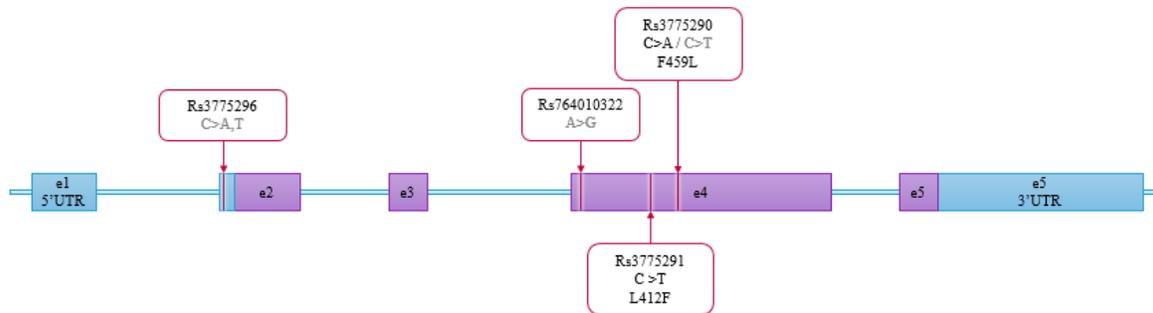


Figura 13. Locación SNPs evidenciados en este estudio en el gen TLR3. Variaciones en gris representan mutaciones sinónimas, variaciones en negro representan variaciones no sinónimas cuyo cambio de aminoácido se encuentra igualmente indicado en fuente negra. No se evidenció ningún SNP en la región codificante del exón 2 ni en el exón 3; la región codificante del exón 5 no fue secuenciada.

6.4 POLIMORFISMOS DE TLR3 EN POBLACIÓN COLOMBIANA

La estructura genética de este receptor ha sido poco estudiada en población colombiana, a la fecha el único reporte que se tiene es el estudio de Avendaño-Tamayo et al (2019) en donde se analiza el comportamiento de la variación rs3775290 entre diferentes grupos poblacionales de Colombia. En este estudio, desafortunadamente no se contó con información referente a grupos poblacionales al interior de Colombia, por lo que un análisis de este tipo no fue posible. Adicionalmente, hasta el momento no se cuenta con información referente a las demás variaciones del gen aquí encontradas para población colombiana.

Se analizó el equilibrio Hardy-Weinberg sobre el grupo de controles. Este análisis evidenció que la población en estudio se encuentra en equilibrio para los SNPs rs3775296 ($p=0,507$), rs3775291 ($p=0,741$) y rs3775290 ($p=0,614$), más no para rs764010322 ($p<0,001$). Este último SNP no se encuentra en equilibrio dado que no se evidenciaron heterocigotos en la muestra.

Posteriormente se hicieron comparaciones pareadas entre las frecuencias alélicas observadas y frecuencias de referencia en distintos grupos poblacionales (población latinoamericana, europea, africana y asiática, Tabla 6) reportadas a partir de proyectos de identificación de variaciones como lo son NCBI ALFA (*National Center for Biotechnology Information Allele Frequency Aggregator*) y ExAC (*The Exome Aggregation Consortium*).

El comportamiento de la población colombiana frente a rs3775296 es bastante similar al de las demás poblaciones evaluadas ($p>0.05$). rs764010322 evidenció un comportamiento diferente. Se observó una diferencia significativa entre las frecuencias observadas para este polimorfismo frente a las reportadas en todos los grupos poblacionales estudiados, lo cual parece estar dado por una

mayor frecuencia de aparición del alelo menos frecuente (G) en la población de estudio, este alelo fue reportado en el 8% de los pacientes muestreados mientras que en población latinoamericana y europea tiene una frecuencia de aparición del 0,009% y 0,003%, respectivamente, además este alelo no se ha evidenciado en población africana ni asiática. En cuanto al SNP rs3775291 el comportamiento es bastante similar en todas las poblaciones, incluyendo la población de estudio, a excepción de la población africana en donde el alelo T tiene una frecuencia de aparición mucho más baja que en las demás poblaciones. Y por último se evidenció que el comportamiento del polimorfismo rs3775290 en la muestra de estudio resultó bastante diferente a las demás poblaciones, esto, ya que se encontró la presencia del alelo C y del alelo T en la muestra de estudio, con una frecuencia del 67% y del 33%, respectivamente, mas no se evidenció el alelo A. Dicho alelo A si se ha evidenciado en población asiática, pero con una baja frecuencia de 0,4% , lo cual no resulta en una diferencia estadísticamente significativa frente a la muestra de estudio ($p>0.05$). En población latinoamericana, europea y africana, por otro lado, este alelo A tiene una mayor frecuencia de aparición, 3,4%, 22,7% y 6,7% respectivamente, lo cual si supone una diferencia con a muestra aquí evaluada ($p>0,05$); además, cabe mencionar que otra diferencia evidenciada con estas poblaciones es que, en población europea a diferencia de la muestra, la frecuencia del alelo A es mayor a la del alelo T, y en población africana, las frecuencias de estos dos alelos son muy similares.

Tabla 6. Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) observadas en gen TLR3 en pacientes con LC (controles) y frecuencias reportadas por NCBI ALFA (*National Center for Biotechnology Information Allele Frequency Aggregator*) y en ExAC (*The Exome Aggregation Consortium*) para diferentes grupos poblacionales

SNPs	Locación	Alelo	Muestra	Población latinoamericana			Población Europea			Población Africana			Población Asiática							
			n	Frecuencias observadas	n	Frecuencias reportadas	P Value*	n	Frecuencias reportadas	P Value*	n	Frecuencias reportadas	P Value*	n	Frecuencias reportadas	P Value*				
rs3775296	5'UTR Exón 2	C	60	0,808	1.484	0,827	0,708	3.185.546	0,812	0,942	111.718	0,842	0,475	6.964	0,772	0,504				
		A		0,192					0,173						0,188			0,158		0,228
rs764010322 ⁺	Exón 4	A	50	0,920	11.578	0,99991	< 0,0001	773.352	0,99997	< 0,0001	110.404	1	< 0,0001	2.516.622	1	< 0,0001				
		G		0,080					0,00009						0,00003			0		0
rs3775291	Exón 4	C	56	0,661	5.010	0,728	0,265	302.672	0,707	0,451	12.028	0,942	< 0,0001	6.982	0,691	0,628				
		T		0,339					0,272						0,293			0,058		0,309
rs3775290	Exón 4	C	49	0,670	696	0,818	0,002	178.632	0,705	< 0,0001	4.258	0,855	< 0,0001	6.266	0,668	0,906				
		T		0,330					0,148						0,072			0,078		0,328
		A		0,00					0,034						0,223			0,067		0,004

⁺ Para este SNP se muestra frecuencias obtenidas de ExAC, en este no se reportan frecuencias específicas para Latinoamérica sino generales de población americana

* Valor P obtenido a mediante Prueba χ^2 de Pearson para la comparación entre frecuencias observadas y las frecuencias para cada una de las poblaciones

Análisis estadísticos detallados en Anexo 1 – Análisis estadísticos: Polimorfismos de TLR3 en población colombiana

6.5 EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE TLR3 Y EL DESARROLLO DE LEISHMANIASIS MUCOSA

Tras la genotipificación de TLR3 en muestras clínicas de pacientes diagnosticados con LM y LC, y la identificación de 4 polimorfismos en los exones 2 y 4 del mismo, se determinaron las frecuencias alélicas de cada uno de los SNPs encontrados. Partiendo del análisis de equilibrio Hardy-Weinberg ya mencionado, en donde se evidenció que la población de estudio no se encontraba estratificada para ninguna de las variaciones en estudio a excepción de rs764010322, se procedió a efectuar análisis de asociación entre los alelos registrados para los polimorfismos en equilibrio y el desarrollo de LM. Para ello, se discriminaron las frecuencias alélicas absolutas de los SNPs por grupos, casos y controles, se determinaron frecuencias alélicas relativas (Tabla 7) y se efectuó una comparación de ambos grupos mediante un test exacto de Fisher para evaluar si existe alguna asociación entre los alelos evidenciados y el desarrollo de LM. Como se puede observar en la Figura 14, la distribución de frecuencia alélicas entre casos y controles es muy similar, por lo que no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$, Tabla 7) que sugiriera alguna asociación entre uno de los alelos evidenciados y el desarrollo de LM.

Tabla 7. Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con LC y pacientes con LM

SNPs	Locación	Alelo	LC		LM		P-value*	OR	(IC 95%)
			Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas			
rs3775296	5'UTR	C	97	0,808	31	0,738	0,336	1,49	(0,58 - 3,63)
		A	23	0,192	11	0,262			
rs764010322	Exón 4	A	92	0,920	38	0,950	0,316	1,41	(0,68 - 2,88)
		G	8	0,080	2	0,050			
rs3775291	Exón 4	C	72	0,655	31	0,574	0,865	0,94	(0,41 - 2,08)
		T	38	0,345	23	0,426			
rs3775290	Exón 4	C	66	0,673	33	0,688	0,313	0,94	(0,41 - 2,08)
		T	32	0,327	15	0,313			

* Valor P obtenido a mediante Prueba χ^2 de Pearson

Análisis estadísticos detallados en Anexo 1 – Análisis estadísticos: Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa

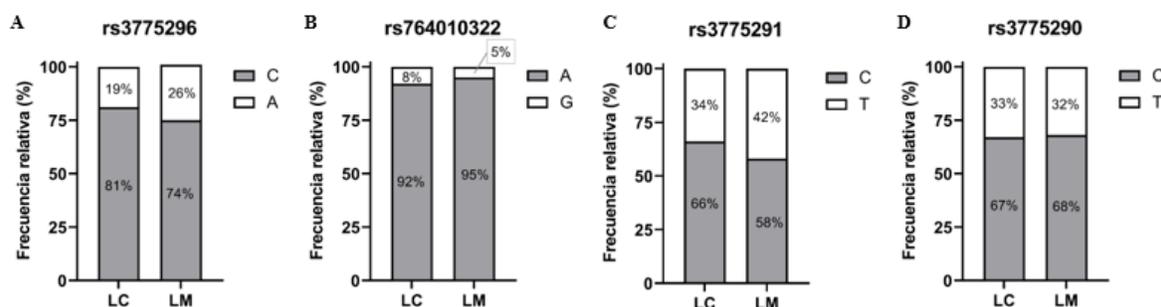


Figura 14. Distribución de frecuencias alélicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en los casos (LM) y controles (LC). Para los cuatro polimorfismos analizados se encuentra una distribución de frecuencias alélicas semejante entre los grupos analizados, por lo que no se evidenció ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p>0,05$)

Dado que no se evidenció que la presencia de ningún alelo de cada uno de los SNPs encontrados estuviera relacionado con el desarrollo de LM; se procedió a evaluar si el genotipo para cada una de las variaciones evidenciadas podría estar relacionado con el desarrollo de LM. La Tabla 8 muestra la distribución de frecuencias genotípicas de cada polimorfismo en la muestra de estudio, discriminada entre casos (LM) y controles (LC). Como se puede evidenciar en la Figura 15, la distribución de frecuencias genotípicas entre casos y controles es muy similar para los cuatro polimorfismos evidenciados. Al efectuar el test de Fisher para comparar los grupos, nuevamente no se evidenció ninguna asociación entre los genotipos registrados y el desarrollo de LM ($p>0,05$, Tabla 8)

Tabla 8. Distribución de frecuencias genotípicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con LC y pacientes con LM

SNPs	Locación	Genotipo	LC		LM		P-value*
			Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	
rs3775296	5'UTR	CC	40	0,667	10	0,476	0,125
		CA	17	0,283	11	0,524	
		AA	3	0,050	0	0,000	
rs764010322	Exón 4	AA	46	0,920	19	0,950	0,443
		AG	0	0,000	0	0,000	
		GG	4	0,080	1	0,050	
rs3775291	Exón 4	CC	24	0,436	8	0,296	0,883
		CT	24	0,436	15	0,556	
		TT	7	0,127	4	0,148	
rs3775290	Exón 4	CC	23	0,469	11	0,458	0,883
		CT	20	0,408	11	0,458	
		TT	6	0,122	2	0,083	

* Valor P obtenido a mediante Test exacto de Fisher

Análisis estadísticos detallados en Anexo 1 – Análisis estadísticos: Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa

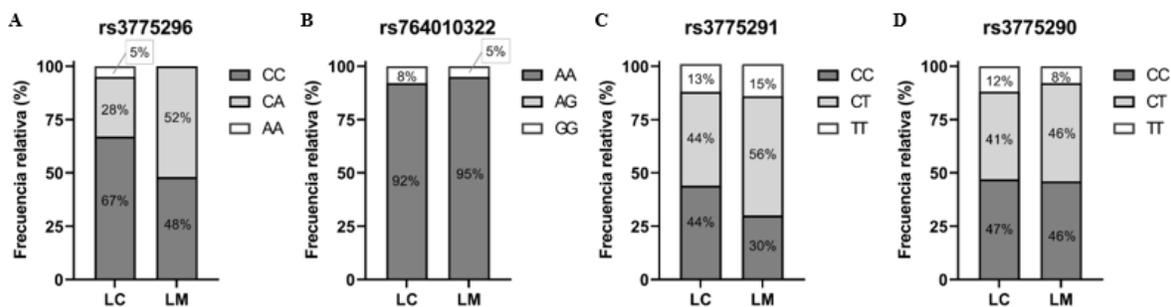


Figura 15. Distribución de frecuencias genotípicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en los casos (LM) y controles (LC). Para los cuatro polimorfismos analizados se encuentra una distribución de frecuencias genotípicas semejante entre los grupos analizados, por lo que no se evidenció ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p > 0,05$)

6.6 EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE TLR3 Y EL DESARROLLO DE LEISHMANIASIS MUCOSA EN EL CONTEXTO DE COINFECCIÓN LEISHMANIA SPP. - LRV1

TLR3 es un PRR endosomal que se activa tras el reconocimiento de dsRNAs (Abbas et al., 2015) como lo es el genoma de LRV1, virus que infecta parásitos del género *Leishmania*, y se ha evidenciado la activación de dicho receptor durante procesos de coinfección *Leishmania* spp. - LRV1 (Ives et al., 2011). Es por ello, que pretende evaluar si las variaciones inducidas en este receptor a raíz de la presencia de SNPs en su gen codificante podrían estar asociadas con el desarrollo de LM en el contexto de coinfección *Leishmania* spp. - LRV1. Nuevamente se efectuó un análisis de equilibrio Hardy-Weinberg sobre los controles LRV1+, donde una vez más se evidenció que la muestra cumple con el equilibrio para los polimorfismos rs3775296, rs3775291 y rs3775290, por lo que se prosiguió con los análisis e asociación sobre estos, más el SNP rs764010322 no cumplió con el equilibrio, por lo que no fue sujeto a los análisis subsiguientes.

Posteriormente, se efectuaron comparaciones mediante un Test exacto de Fisher de la distribución de frecuencia alélicas de cada SNP evidenciado en este estudio entre el grupo de casos y el grupo de controles, esto únicamente para aquellas muestras a quienes previamente se le había identificado la presencia del LRV1 mediante RT-qPCR, es decir 20 casos y 10 controles. En la se evidencian las frecuencias alélicas encontradas en la muestra de pacientes LRV1+ para los diferentes SNPs encontrados. Como se puede apreciar en la Figura 16, la distribución de frecuencias es muy similar

entre casos y controles, por lo que no se evidencia ninguna relación entre las frecuencias alélicas encontradas y el desarrollo de LM en el contexto de coinfección con LRV1 ($p>0,05$, Tabla 9).

Tabla 9. Distribución de frecuencias alélicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con LC y pacientes con LM que presentan Leishmania RNA virus 1 (LRV1+)

SNPs	Locación	Alelo	LC		LM		P-value*	OR	IC 95%
			Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas			
rs3775296	5'UTR	C	9	0,90	6	0,75	0,558	2,82	(0,121 - 195,98)
		A	1	0,10	2	0,25			
rs764010322	Exón 4	A	10	1,00	14	1,00	0,702	1,53	(0,25 - 11,98)
		G	0	0,00	0	0,00			
rs3775291	Exón 4	C	7	0,70	12	0,60	0,702	1,53	(0,25 - 11,98)
		T	3	0,30	8	0,40			
rs3775290	Exón 4	C	7	0,70	12	0,60	0,702	1,53	(0,25 - 11,98)
		T	3	0,30	8	0,40			

* Valor P obtenido a mediante Test exacto de Fisher

Análisis estadísticos detallados en Anexo 1 – Análisis estadísticos: Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa en el contexto de coinfección Leishmania spp. - LRV1

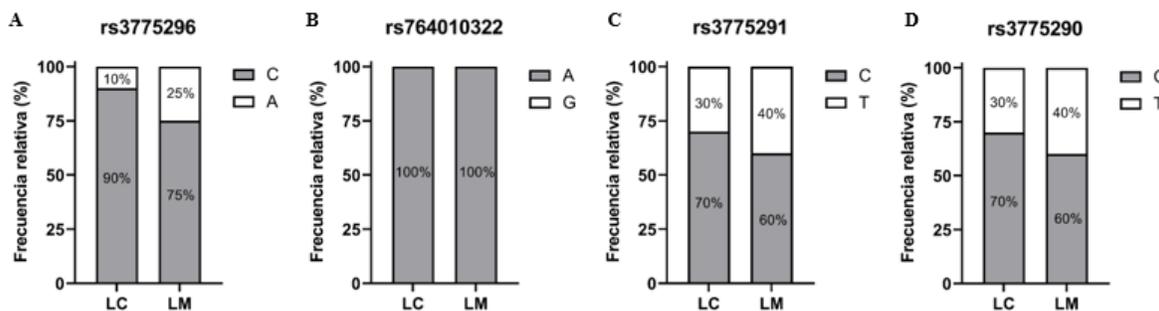


Figura 16. Distribución de frecuencias alélicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en casos (LM) y controles (LC) LRV1+. Para los cuatro polimorfismos analizados se encuentra una distribución de frecuencias alélicas semejante entre los grupos analizados, por lo que no se evidenció ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p>0,05$)

De igual forma, se evaluó si existía una relación entre los genotipos del polimorfismo en estudio con el desarrollo de LM en el contexto de coinfección con LRV1. Se establecieron las frecuencias genotípicas de los SNPs en casos y controles únicamente de muestras LRV1+ () y se evidenció un comportamiento similar entre estos dos grupos comparados (Figura 17), lo cual se confirmó mediante un test exacto de Fisher en donde no se evidenciaron diferencias significativas entre grupos ($p>0,05$, Tabla 10)

Tabla 10. Distribución de frecuencias genotípicas de polimorfismos (SNPs) evidenciados en gen TLR3 en pacientes con LC y pacientes con LM que presentan Leishmania RNA virus 1 (LRV1+)

SNPs	Locación	Genotipo	LC		LM		P-value*	
			Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas		
rs3775296	5'UTR	CC	4	0,8	2	0,5	0,5238	
		CA	1	0,2	2	0,5		
		AA	0	0,0	0	0,0		
rs764010322	Exón 4	AA	5	1,0	7	1,0		
		AG	0	0,0	0	0,0		
		GG	0	0,0	0	0,0		
rs3775291	Exón 4	CC	2	0,4	3	0,3	1	
		CT	3	0,6	6	0,6		
		TT	0	0,0	1	0,1		
rs3775290	Exón 4	CC	3	0,6	4	0,4		0,7902
		CT	1	0,2	4	0,4		
		TT	1	0,2	2	0,2		

* Valor P obtenido a mediante Test exacto de Fisher

Análisis estadísticos detallados en Anexo 1 – Análisis estadísticos: Evaluación de la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de TLR3 y el desarrollo de Leishmaniasis mucosa en el contexto de coinfección Leishmania spp. - LRV1

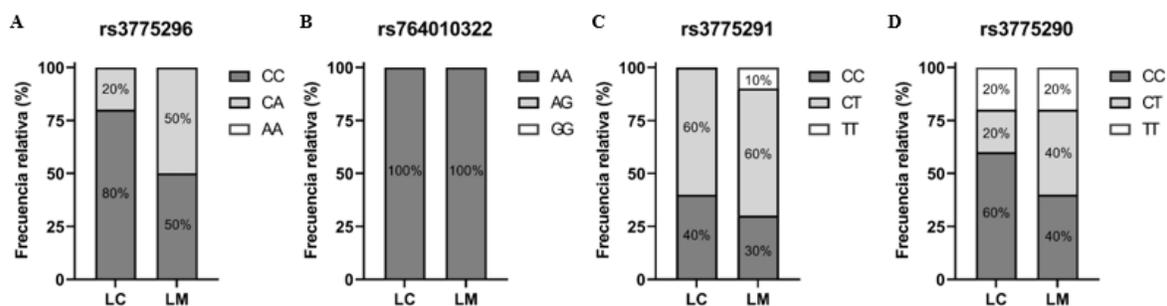


Figura 17. Distribución de frecuencias genotípicas relativas de los polimorfismos rs3775296 (A) rs764010322 (B), rs3775291 (C) y rs3775290 (D) en casos (LM) y controles (LC) LRV1+. Para los cuatro polimorfismos analizados se encuentra una distribución de frecuencias genotípicas semejante entre los grupos analizados, por lo que no se evidenció ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p > 0,05$)

7 DISCUSIÓN

TLR3 es PRR endosomal que reconoce dsRNAs y activa lo que se conoce como una respuesta inmune antiviral mediada por IFNs tipo 1 (Abbas et al., 2015). Ensayos *in vivo* con ratones *TLR3*^{-/-} han relacionado este receptor con la persistencia parasitaria, el incremento de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y con una mayor inflamación localizada y diseminada, en contexto de infección *Leishmania* – LRV1 (Ives et al., 2011; Rossi et al., 2017). El estudio de inmunopolimorfismos ha evidenciado que las variaciones genéticas de algunos actores del sistema inmune pueden relacionarse con procesos de resistencia o susceptibilidad a infecciones de diferente índole (Suprabhat Mukherjee et al., 2019; Schröder & Schumann, 2005). En el caso de TLR3, la variación L412F (rs3775291) ha sido ampliamente estudiada en contextos de infección viral y se ha evidenciado que, dependiendo de la infección, puede inducir susceptibilidad como es el caso de la infección por virus de DNA como citomegalovirus (Studzińska et al., 2017), Herpes virus tipo 1 (Yang et al., 2012) o Hepatitis B (HBV), así como en virus de RNA monocatenario como Virus de la Hepatitis C (HCV) (Geng et al., 2016), entre otros; sin embargo, en otros contextos, también de virus de DNA bicatenarios como Herpes virus tipo 2 (Svensson et al., 2012) o en virus de RNA retrotranscrito como VIH (Sironi et al., 2012), se ha evidenciado una menor incidencia de infección al presentar el alelo T que induce la variación L412F. A partir de esto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar si existía alguna asociación entre los polimorfismos de TLR3 presentes en población colombiana y el desarrollo de Leishmaniasis, más puntualmente de LM, y si existía una asociación con esta en el contexto de coinfección *Leishmania*-LRV1.

LRV1, es un virus que infecta el parásito *Leishmania* y que se ha visto asociado con el desarrollo de LM. Cantanhêde y colaboradores (2015) evidencian una frecuencia de aparición de LRV1 en muestras provenientes de pacientes con LM en Brasil del 71,%, frente a una frecuencia del 63,3% en pacientes con LC; este estudio, evidenció una asociación entre la presencia de dicho virus y el desarrollo de LM con un riesgo relativo de 2,93 (CI95% 1,57 – 5,46, $p < 0,001$). Por otro lado, Pazmiño, et al. (2021) reportan en población colombiana que la presencia de este virus en pacientes con LM es del 33,3% y del 8,6% en pacientes con LC, si bien las frecuencias evidenciadas en este estudio son más bajas que las evidenciadas por Cantanhêde y colaboradores (2015), este estudio también evidenció una asociación entre estas variables, donde la presencia de LRV1 incrementa en 6,86 (IC95%: 1,48 – 27,00, $p = 0,0014$) veces el riesgo de desarrollar LM frente a infecciones carentes de este virus. El presente este estudio se evidenció una asociación entre la presencia de LRV1 y el desarrollo de LM, con un OR de 6,824 (IC95%: 1,847 – 28,933, $p = 0,0012$).

Otra variable que se observó que puede estar asociada con el desarrollo de LM fue la variable tratamiento para LC ($p < 0,0001$). Frente a ésta, como se muestra en la Tabla 4, se encontró que la totalidad de los pacientes que no recibieron ningún tipo de tratamiento para LC se distribuían en el grupo de casos, pacientes que no recibieron tratamiento ya sea porque no desarrollaron lesión cutánea previa al evento mucoso o por otras razones. En este estudio se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados para esta variable, lo cual podría explicarse ya que otros estudios reportan que el no obtener tratamiento para LC puede resultar un factor de riesgo para el desarrollo de LM (Muñoz & Davies, 2006; Fredy Alexander Pazmiño, 2020). Además de estas dos variables, tras evaluar otros posibles factores de riesgo como lo son: sexo, edad a la hora de adquirir el evento cutáneo, especie infectante de *Leishmania*, entre otros, no se evidenció ningún otro factor que pudiese influir en el desenlace mucoso de la infección.

Posteriormente, se analizaron los exones dos, tres y cuatro del gen TLR3, los cuales codifican cerca del 91,5% del receptor. Se encontraron 4 polimorfismos en la población de estudio: un polimorfismo sobre la región 5'UTR (rs3775296), dos mutaciones sinónimas en el exón 4 (rs764010322 y rs3775290) y una mutación no sinónima (rs3775291) que corresponde a la variación L412F, ubicada sobre el dominio de reconocimiento de dsRNA aproximadamente en la LRR15 (UniProt, n.d.).

rs3775296 es una variación C > A en la región 5'UTR de TLR3 que ocurre 7 nucleótidos antes del ORF. El alelo menos frecuente de esta variación (A) tiene una frecuencia de aparición de entre el 15% y el 22% en la población mundial, de acuerdo con los datos reportados en ALFA NCBI. Este estudio reportó una frecuencia del 19,2% para la totalidad de la muestra (Tabla 5 **Error! Reference source not found.** y Tabla 6) por lo que la distribución de frecuencias alélicas de la población colombiana evaluada resulta muy similar al comportamiento reportado para la población mundial.

Dado que esta es una variación relativamente frecuente, se han efectuado diversos estudios de asociación genómica para evaluar las implicaciones de esta en contextos de infección viral y cáncer. Este SNP no presentó ninguna asociación con el desarrollo de la infección por Virus de la Hepatitis C (Zayed et al., 2017) ni con citomegalovirus (Studzinska et al., 2017), frente a este último se evidenció una mayor frecuencia de heterocigotos en individuos infectados e incluso se llegó a plantear que este genotipo duplicaba el riesgo de infección por citomegalovirus, pero esta conclusión se descartó tras efectuar una corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Por otro lado, estudios reportan una distribución desigual de frecuencia alélicas y genotípicas entre pacientes infectados y no infectados con virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1), con un OR de 0,603 (IC95%: 0,380-0,957) se evidenció que la presencia del alelo A resultaba un

factor protector ante la infección con HTLV-1 (Habibabadi et al., 2020). En contraparte a esto, es alelo A se asoció con la aparición de cáncer de seno y se evidenció una mayor frecuencia de este en pacientes con tumores de mayor tamaño, por lo que se reporta como un factor de mal pronóstico y susceptibilidad a este tipo de cáncer. Aún no es totalmente claro el mecanismo mediante el cual podría ocurrir esto, Habibabadi y colaboradores (2020) plantearon la posibilidad de una desregulación de la expresión de este receptor tras la modificación de su región 5'UTR, no obstante, efectuaron un ensayo de expresión para esta variante y no encontraron variaciones frente a la presencia del alelo común.

El trabajo aquí presentado, efectuó un análisis de asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de LM con o sin la infección con LRV1; como resultado, similar a lo que ocurre con HCV y HCMV, esta variación no parece relacionarse ni con un efecto protector ni con un mayor riesgo de desarrollo de LM.

El segundo SNP evidenciado (rs764010322) es el cambio A > G en el nucleótido 735, la modificación ocurre en el tercer nucleótido del codón codificante para el aminoácido 245 del receptor; constituye una mutación sinónima, por lo que la leucina allí codificada no varía frente a este SNP. Para este polimorfismo el proyecto ALFA NCBI reporta una frecuencia de 1 para el alelo A y 0 para el alelo G en todas las poblaciones muestreadas; el proyecto ExAC, por otro lado, si ha evidenciado esta variación en los exomas secuenciados, pero con una muy baja frecuencia de aparición del alelo G, una frecuencia global de aproximadamente 0,0025%. En el presente trabajo se evidenció una frecuencia de aparición del alelo G del 8%, lo cual resulta significativamente mayor incluso que la población latinoamericana ($p < 0,0001$, Tabla 6). Cabe resaltar que una observación bastante llamativa de este estudio fue la ausencia de heterocigotos en la población, se encontró un total de 65 individuos con genotipo homocigoto para el alelo más frecuente, AA, y 5 homocigotos para el alelo menos frecuente, GG. Dada su baja frecuencia, más allá del reporte de la variación rs764010322, no se tiene mayor información sobre las implicaciones que podría o no llegar a tener, ya que a la fecha la única información al respecto disponible es un reporte en la base de datos ClinVar (VCV000792634.2) en donde se plantea un posible rol benigno ante encefalitis por Herpes virus simplex-1 (NCBI, 2018).

En el presente estudio no se evaluó la asociación de la variante rs764010322 de TLR3 con el desarrollo de LM, ya que tras evaluar el equilibrio Hardy-Weinberg sobre el grupo de controles, se encontró que la población de estudio dista de estar en equilibrio para este SNP en particular. La ley de Hardy-Weinberg plantea que el pool genético de una población, que cumple con algunos supuestos, es constante; lo que significa que las frecuencias alélicas de un determinado gen

prevalecen a lo largo de las generaciones y a partir de ello es posible predecir las frecuencias genotípicas dentro de la población. Los supuestos de los que parte la ley de Hardy-Weinberg son: (1) la población es muy grande, virtualmente infinita, (2) los organismos que la componen son diploides, (3) la reproducción de estos es sexual, pero no existen procesos de selección sexual por lo que el apareamiento es aleatorio, (4) no hay migración, flujo génico ni estructuración poblacional, (5) no hay mutación o su tasa es tan baja que resulta despreciable, y finalmente (6) no hay presiones de selección evolutiva que afecten a los alelos en consideración (Hamilton, 2009; Lorenzano, 2014). Evaluar el equilibrio Hardy-Weinberg es fundamental para desarrollar estudios de asociación genómica, ya que permite identificar la existencia de sesgos que pueden influenciar los resultados de asociación que se encuentren.

Cuando una población no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, significa que alguno de los supuestos de los que se parte no se está cumpliendo, es decir que puede tratarse de una población pequeña, una población estructurada o estratificada, que existe algún tipo de presión de selección ya sea sexual o evolutiva, o que hubo un proceso de mutación relativamente reciente que aún no alcanza el equilibrio; esto en cuanto a características propias de la población, no obstante, otro factor que puede influir en el análisis de equilibrio son errores durante el proceso de genotipificación (Soriguer & Morcillo, 2007). El SPNs rs764010322 no se encuentra en equilibrio en la población analizada, lo cual ocurre debido a que la ausencia de heterocigotos evidencia una estructura genotípica diferente a la que se esperaría a partir de las frecuencias alélicas observadas. La identificación de heterocigotos en este estudio se efectuó evidenciando dobles picos en los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación por electroforesis en capilar, mientras los homocigotos se determinaron mediante la aparición de picos sencillos. Mediante esta metodología, errores comunes en la secuenciación podrían generar ruido que de manera artificial simularan la presencia de heterocigotos. Esto es consecuente con lo reportado por Chen, Cole y Grond-Ginsbach (2017) quienes, a partir de un análisis de genomas contenidos en la base de datos ExAC, mencionan que la ganancia de heterocigotos puede asociarse errores de genotipificación y que, por el contrario, la pérdida de estos, como se observa en este estudio, podría deberse a procesos biológicos. Bajo esta premisa, se podría menospreciar la incidencia de errores de genotipificación en el fenómeno aquí observado; sin embargo, cabe mencionar que el mecanismo que genotipificación implementado no es el más robusto para la identificación de heterocigotos por lo que para descartar esta variable sería necesario implementar otras técnicas mucho más específicas como PCR-RFLP o secuenciación posterior a clonación.

Menospreciando la posible incidencia del error de genotipificación en este resultado, es posible que este fenómeno se explique por algún tipo de selección natural purificadora, es decir una tendencia evolutiva hacia la pérdida de esta variante, lo cual sería consecuente con las muy bajas frecuencias de aparición del alelo menos frecuente en población global. También vale la pena resaltar que la totalidad de las muestras secuenciadas proceden de pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis, lo que podría *per se* inducir un sesgo en la población de estudio que no es posible detectar dada la carencia de controles sanos, los cuales no se evaluaron por el objetivo mismo de la investigación. A partir de esto, dicho polimorfismo no fue objeto de análisis de asociación debido a que las razones que explican el porqué del no estar en equilibrio Hardy-Weinberg, pueden inducir sesgos dentro de los análisis de asociación, haciendo de los resultados de los mismos sean poco confiables.

La segunda mutación sinónima encontrada (rs3775290) corresponde a la variación C > T en el nucleótido 1377, en esta posición también ocurre la mutación no sinónima C > A que induce el cambio F > L en aminoácido 459, pero dicho alelo A no fue evidenciado en la población de estudio. La variación C1377T ha sido mayoritariamente estudiada en contexto de infecciones virales; en población de medio oriente se ha evidenciado que la aparición del alelo menos frecuente T puede estar asociado con una mayor severidad en infecciones por Virus de la hepatitis B y C (Sghaier et al., 2019), frente a este último el alelo más frecuente C se encontró en una mayor proporción en pacientes que lograban resolver la infección frente a paciente crónicos, indicativo de un efecto protector para el desarrollo de la infección crónica (El-Bendary et al., 2018; Hamdy et al., 2018). Este SNPs también ha sido estudiado de forma local, Avendaño-Tamayo et al. (2019) reportan que en población colombiana afrodescendiente y mestiza la presencia del alelo T parece ser un factor de susceptibilidad ante la infección por virus Dengue y el desarrollo de fiebre del dengue; sin embargo, otros autores mencionan que el alelo C es quien se asocia a la susceptibilidad frente virus dengue, como lo reportan Mukherjee y Tripathi (2019) en población india.

Al contrastar el comportamiento de este polimorfismo en la muestra de estudio frente a otras poblaciones, se evidenció que la muestra se comporta de manera diferente a poblaciones pertenecientes a Latinoamérica, Europa y África ($p < 0,05$), pero similar a población asiática ($p > 0,05$), como se pueden ver en la Tabla 6. Adicionalmente, se contrastaron los datos obtenidos frente los datos disponibles para este polimorfismo en población colombiana; Avendaño-Tamayo et al. (2019) evaluaron este polimorfismo en dos subpoblaciones en Colombia, afrocolombianos y mestizos, y reportan, al igual que en este estudio, las frecuencias alélicas del alelo menos frecuente T. Frente a este estudio no se encontraron diferencias significativas entre la muestra estudiada y la

totalidad de población allí reportada, así como tampoco se encontraron diferencias con las subpoblaciones afrocolombianas y mestizas ($p > 0,05$).

La muestra de estudio se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para la variación rs3775290, el comportamiento genotípico corresponde al esperado de acuerdo con las frecuencias alélicas observadas para los dos alelos encontrados; esto permitió efectuar los análisis de asociación subsiguientes. Al evaluar el comportamiento de los casos frente a los controles, se encontró que la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas entre estos grupos era semejante ($p > 0,05$). De igual forma, el análisis efectuado sobre la subpoblación LRV1+ evidenció comportamientos similares entre casos y controles tanto para la distribución de frecuencias alélicas como frecuencias genotípicas ($p > 0,05$). Esto muestra que para la muestra de estudio no existe ninguna asociación entre el desarrollo de LM y la presencia de alguno de los alelos o genotipos posibles para esta variación, ni en contexto de infección por *Leishmania* spp. únicamente, ni en contexto de coinfección con LRV1.

Finalmente fue posible evidenciar el SNP rs3775291, el cual constituye una mutación no sinónima ampliamente estudiada para este gen. Esta variación es un cambio C > T y tiene lugar en el nucleótido 1234, lo que conlleva a la variación Leu > Phe en el aminoácido número 412. Este aminoácido se ubica en la LRR número 15, muy cerca de la zona cóncava del ectodominio y de la región de reconocimiento de patrón (Choe et al., 2005; Ranjith-Kumar et al., 2007; UniProt, n.d.). Tanto Leucina como Fenilalanina son aminoácidos de carácter neutro (R. K. Murray et al., 2013), no obstante, Fenilalanina es un aminoácido aromático voluminoso, por lo que su presencia en esta posición induce un ligero cambio conformacional en el ectodominio del receptor, que puede alterar las interacciones hidrofóbicas al interior del núcleo del solenoide e inducir variaciones en las glicosilaciones de aminoácidos cercanos (Ranjith-Kumar et al., 2007). Esta variación no parece alterar la expresión del receptor, pero puede conllevar a alteraciones en la señalización de éste quizá debido a una menor afinidad del receptor por su ligando: dsRNA, lo que se ha evidenciado como una disminución en la activación de genes con elementos de respuesta a NF- κ B en su promotor (Fan et al., 2019; Ranjith-Kumar et al., 2007).

Diversos estudios han evidenciado una asociación entre esta variación y el desarrollo clínico tras infecciones virales. Se sabe por ejemplo que ésta variación está asociada al riesgo de infección por HBV y su desarrollo crónico (Fischer et al., 2018; Xia et al., 2020), aunque no es claro el mecanismo biológico mediante el cual esto podría explicarse, ya que HBV es un virus de DNA (Vargas Córdoba, 2016). De igual forma, en contexto de infección por HCV, se ha evidenciado una asociación del alelo T con el desarrollo crónico de la infección, mientras el alelo C es más frecuente

en pacientes que logran resolver la infección de forma espontánea (El-Bendary et al., 2018). El alelo T también ha sido asociado con un mayor riesgo de desarrollo de fiebre hemorrágica tras la infección por dengue (Alagarasu et al., 2015) y un mayor riesgo de aparición de síndrome congénito por Zika y, por consiguiente, de microcefalia en niños cuya madre adquiere la infección con Zika virus durante la gestación (Santos et al., 2019). Sin embargo, dicho alelo menos frecuente de rs3775291 no siempre se asocia a susceptibilidad o riesgo a complicaciones debido a infecciones virales, en VIH se ha visto un carácter protector el cual no parece deberse a un reconocimiento directo de VIH por el receptor sino a que su activación, quizá por un agente desconocido, permite generar una respuesta antiviral robusta que actúa en defensa contra VIH (Sironi et al., 2012). Cabe resaltar también, que no solo en contextos de infección viral se ha evidenciado asociación de este polimorfismo con el desenlace de la infección; esta mutación no sinónima también se ha visto relacionada con susceptibilidad a *Candida albicans*, esto al parecer ocasionado por una alteración en la respuesta inmune, la cual induce una disminución en la expresión de IFN- γ y un menor control de la infección (Nahum et al., 2011).

Candidiasis, al igual que leishmaniasis, es una enfermedad infecciosa de tipo tegumentario cuyo desarrollo, como ya se mencionó, se ha visto influenciado por la presencia del polimorfismo rs3775291. En el caso de leishmaniasis tegumentaria, el presente estudio no muestra una asociación entre la presencia de dicho SNP y el desarrollo clínico de la enfermedad, lo cual se concluye al observar una distribución tanto de frecuencias alélicas como genotípicas semejantes entre pacientes diagnosticados con LC y pacientes diagnosticados con LM. Dado que este SNP es una mutación no sinónima que tiene implicaciones en el ectodominio del receptor, dominio encargado del reconocimiento de patrón, y que se ha evidenciado una relevancia de dicho receptor tras la infección *Leishmania* spp.-LRV1, quizá dada por el reconocimiento del genoma dsRNA de LRV1 (Ives et al., 2011), se analizó si existía alguna asociación entre el polimorfismo y el desarrollo clínico en ese contexto; en este caso tampoco se evidenció ninguna asociación. Sin embargo, este polimorfismo parece ser bastante relevante como factor genético asociado a susceptibilidad o resistencia ante otros agentes infecciosos, por lo resulta importante comprender su comportamiento en el ámbito poblacional en el que nos vemos inmersos.

Este estudio resulta un primer acercamiento al entendimiento del comportamiento de la variación rs3775291 del gen TLR3 en población colombiana, así como para las variaciones rs375296 y rs764010322 ya mencionadas. Se evidenció que, para la muestra analizada, el comportamiento de rs3775291 es muy similar al de la población latinoamericana, quizá con una tendencia a una mayor frecuencia del alelo menos frecuente T, pero sin diferencias significativas entre ambos grupos

($p > 0,05$). Como se muestra en la Tabla 6, el comportamiento de la muestra tampoco resulta estadísticamente diferente al comportamiento de población europea ni asiática, pero sí al de población africana; esto se debe al comportamiento diferente de esta población frente a la demás evaluadas.

La población africana, de acuerdo con la distribución de frecuencias consignadas en ALFA NCBI, tiene un comportamiento diferente para la variación rs3775291, al compararla con las demás poblaciones, dada una menor frecuencia de aparición del alelo T ($p < 0,05$, test χ^2 de Pearson). La frecuencia de este alelo para dicha población es de 5,8% mientras que las demás poblaciones allí reportadas presentan frecuencias de entre 23,8% y 35,3% (Phan et al., 2020), y la muestra de estudio posee una frecuencia del 33,9%. Algo notable que vale pena mencionar es que, dentro de las demás poblaciones reportadas en dicha base de datos, la población de mayor similitud a población africana es la población afroamericana, cuya frecuencia del alelo T es de 5,9%, mientras que la población latinoamericana de ascendencia afrocaribeña presenta un comportamiento diferente a este y más similar a la población latinoamericana de ascendencia europea e indígena.

Este fenómeno de similitud de frecuencias alélicas para rs3775291 entre población africana y afroamericana también se evidenció para el polimorfismo rs3775290 ya discutido; esto debido a la cercanía en el gen de estos dos SNP que conlleva a su desequilibrio de ligamiento (Wang, Yi & Liu 2015). No obstante, vale la pena resaltar que estos dos polimorfismos no se comportan exactamente igual en todas las poblaciones, por lo que a futuro es necesario plantear estudios enfocados a la construcción de redes de haplotipos, evaluación del desequilibrio de ligamiento y reloj molecular para realmente lograr entender el comportamiento de este gen en las poblaciones humanas.

8 CONCLUSIONES

- No se evidenció asociación entre los SNPs encontrados en este estudio (rs3775296, rs764010322, rs3775290 ni rs3775291) y el desarrollo de LM en infecciones a humanos por *Leishmania* spp
- No se evidenció asociación entre alguno de estos SNPs y el desarrollo de LM en coinfecciones a humanos por *Leishmania* spp-LRV1
- Se encontró una asociación entre la presencia de LRV1 y el desarrollo de LM, con un OR crudo de 6,824 (IC95%: 1,847 – 28,933).
- Se encontró una diferencia estadísticamente significativa para la variable “Tratamiento para LC” entre pacientes diagnosticados con LM y pacientes con LC
- La población colombiana analizada presenta un comportamiento similar otras poblaciones (latinoamericana, europea, africana y asiática) en cuanto a la distribución de frecuencias alélica para los polimorfismos rs3775296 y rs3775291.
- La población colombiana analizada se comporta diferente a las demás poblaciones a nivel mundial frente al polimorfismo rs764010322, ya que se evidenció una mayor frecuencia de aparición del alelo menos frecuente en la población de estudio frente a las demás poblaciones.
- La población colombiana analizada se comporta diferente a las demás poblaciones a nivel mundial frente al polimorfismo rs3775290, ya que no se evidenció la presencia de uno de los tres alelos que pueden presentarse en esta variación, alelo que sí se registra en las demás poblaciones analizadas, incluyendo población latinoamericana.

9 PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las principales limitaciones de este estudio, fue que el tamaño de muestra implementado fue a conveniencia, dado que se efectuó un estudio retrospectivo basado en muestras almacenadas en biobanco, donde la disponibilidad de la muestra, la calidad de esta y la confirmación de la infección por biología molecular, limitaron el número de muestras a las que se pudo acceder. En un principio, si el comportamiento de las frecuencias alélicas la muestra de estudio era similar a frecuencias reportadas en otros estudios, la cantidad de muestras de las cuales se disponía permitirían un análisis con un poder estadístico del 70%, un poco más bajo de lo ideal. Además, la pérdida final de muestras evidenciada tras el proceso de secuenciación limitó aún más el tamaño muestral analizado, sobre todo para el análisis de asociación en contexto de coinfección con LRV1. Es por ello que, para estudios futuros, se recomienda implementar un tamaño de muestra mucho mayor que permita un mejor poder estadístico para el análisis de asociación genómica. Adicionalmente, se recomienda continuar la caracterización del gen TLR3 en población colombiana, dado que diversos estudios han evidenciado asociaciones entre algunas variaciones del gen y el curso de diversas infecciones. Para investigaciones futuras, se recomienda genotipificar pacientes sanos como control adicional para entender las dinámicas poblacionales en contextos de enfermedad, además de aumentar el tamaño de la población genotipificada con miras a aumentar la posibilidad de observar nuevos SNPs, que quizá no se hayan podido evidenciar en este estudio debido al tamaño de muestra limitado y a la restricción impuesta por la necesidad de confirmar el diagnóstico de leishmaniasis.

10 REFERENCIAS

- Abbas, A., Litchman, A., & Pillai, S. (2015). Inmunología celular y molecular. In *El Sevier* (8va ed.).
- Agudelo Chivatá, N. J. (2019a). *Informe de evento: Leishmaniasis cutánea*.
- Agudelo Chivatá, N. J. (2019b). *Informe de evento: Leishmaniasis mucosa*.
- Agudelo, S., & Robledo, S. (2000). Revisión de tema: respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. *Iatreia*, *13*(3), 167–178.
- Akashi-Takamura, S., & Miyake, K. (2006). Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. In *Journal of Infection and Chemotherapy* (Vol. 12, Issue 5, pp. 233–240). Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0477-4>
- Alagarasu, K., Bachal, R. V., Memane, R. S., Shah, P. S., & Cecilia, D. (2015). Polymorphisms in RNA sensing toll like receptor genes and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Immunobiology*, *220*(1), 164–168. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2014.09.020>
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Gómez, M. J., Postigo, M., Molina, R., Jiménez, M., & Larraga, V. (2014). Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*: From the foregut of *Phlebotomus perniciosus* to the human phagocyte. *BMC Genomics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-849>
- Alexander, J., & Russell, D. G. (1992). The Interaction of *Leishmania* Species with Macrophages. *Advances in Parasitology*, *31*(C), 175–254. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60022-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60022-6)
- Alipoor, B., Ghaedi, H., Davood Omrani, M., Bastami, M., Meshkani, R., & Golmohammadi, T. (2016). A Bioinformatics Approach to Prioritize Single Nucleotide Polymorphisms in TLRs Signaling Pathway Genes. *Internationa Journal of Molecular and Celular Medicine*, *5*(2). <http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., & Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, *25*(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/76048>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E.,

- Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2017). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 24. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.16-84256>
- Atayde, V. D., da Silva Lira Filho, A., Chaparro, V., Zimmermann, A., Martel, C., Jaramillo, M., & Olivier, M. (2019). Exploitation of the Leishmania exosomal pathway by Leishmania RNA virus 1. *Nature Microbiology*, 4(4), 714–723. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0352-y>
- Atsaves, V., Leventaki, V., Rassidakis, G. Z., & Claret, F. X. (2019). AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer. *Cancers*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11071037>
- Avendaño-Tamayo, E., Rúa, A., Parra-Marín, M. V., Rojas, W., Campo, O., Chacón-Duque, J., Agudelo-Flórez, P., Narváez, C. F., Salgado, D. M., Restrepo, B. N., & Bedoya, G. (2019). Evaluation of variants in IL6R, TLR3, and DC-SIGN genes associated with dengue in a sampled Colombian population. *Biomedica*, 39(1), 88–101. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4029>
- Awasthi, A., Mathur, R. K., & Saha, B. (2004). Immune response to Leishmania infection. *Indian Journal of Medical Research*, 119(6), 238–258.
- Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology*, 21(12), 568–572. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.011>
- Bailey, M. S., & Lockwood, D. N. J. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, 25(2), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.05.008>
- 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, 1–109. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2006). The molecular structure of the TLR3 extracellular domain. *Journal of Endotoxin Research*, 12(6), 375–378. <https://doi.org/10.1177/09680519060120060801>
- Bogdan, C., & Röllinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: Mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 121–134.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0)

- Bruschi, F., & Gradoni, L. (2018). The leishmaniasis: Old neglected tropical diseases. In *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
- Cadd, T. L., Keenan, M. C., & Patterson, J. L. (1993). Detection of Leishmania RNA Virus 1 Proteins. In *JOURNAL OF VIROLOGY*. <http://jvi.asm.org/>
- Cantanhêde, L. M., da Silva Júnior, C. F., Ito, M. M., Felipin, K. P., Nicolette, R., Salcedo, J. M. V., Porrozi, R., Cupolillo, E., & Ferreira, R. de G. M. (2015). Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004079. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004079>
- CDC. (n.d.). *CDC - Leishmaniasis - Biology*. Retrieved February 27, 2020, from <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
- Centers for disease control and prevention (CDC). (2020, February 14). *CDC - Leishmaniasis*. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>
- Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2014). dsRNA-Activation of TLR3 and RLR Signaling: Gene Induction-Dependent and Independent Effects. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(6), 436. <https://doi.org/10.1089/JIR.2014.0034>
- Chaudhuri, G., Chaudhuri, M., Pan, A., & Chang, K.-P. (1989). Surface Acid Proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(13), 7483–7489.
- Chen, B., Cole, J. W., & Grond-Ginsbach, C. (2017). Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Frontiers in Genetics*, 8(OCT), 167. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2017.00167>
- Chieco, P., & Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(5), 345–358. <https://doi.org/10.1007/s004180050367>
- Choe, J., Kelker, M. S., & Wilson, I. A. (2005). Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain. *Science*, 309(5734), 581–585. <https://doi.org/10.1126/science.1115253>
- Coombs, G., & North, M. (2004). Biochemical Protozoology. In *Journal of Chemical Information and Modeling*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Corthay, A. (2006). A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(2), 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01782.x>
- Croft, S. L., & Molyneux, D. H. (1979). Studies on the ultrastructure, virus-like particles and infectivity of *Leishmania hertigi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73(3), 213–226. <https://doi.org/10.1080/00034983.1979.11687251>
- Cruz-Barrera, M. L., Ovalle-Bracho, C., Ortegón-Vergara, V., Pérez-Franco, J. E., & Echeverry, M. C. (2015). Improving *Leishmania* species identification in different types of samples from cutaneous lesions. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1339–1341. <https://doi.org/10.1128/JCM.02955-14>
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- de Carvalho, R. V. H., Andrade, W. A., Lima-Junior, D. S., Dilucca, M., de Oliveira, C. V., Wang, K., Nogueira, P. M., Rugani, J. N., Soares, R. P., Beverley, S. M., Shao, F., & Zamboni, D. S. (2019). *Leishmania* Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Reports*, 26(2), 429-437.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.12.047>
- de Carvalho, R. V. H., Lima-Junior, D. S., da Silva, M. V. G., Dilucca, M., Rodrigues, T. S., Horta, C. V., Silva, A. L. N., da Silva, P. F., Frantz, F. G., Lorenzon, L. B., Souza, M. M., Almeida, F., Cantanhêde, L. M., Ferreira, R. de G. M., Cruz, A. K., & Zamboni, D. S. (2019). *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13356-2>
- de Carvalho, R. V. H., Lima-Júnior, D. S., de Oliveira, C. V., & Zamboni, D. S. (2021). Endosymbiotic RNA virus inhibits *Leishmania*-induced caspase-11 activation. *IScience*, 24(1), 102004. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.102004>
- de Souza, M. M., Manzine, L. R., da Silva, M. V. G., Bettini, J., Portugal, R. V., Cruz, A. K., Arruda, E., & Thiemann, O. H. (2014). An improved purification procedure for *Leishmania* RNA virus (LRV). *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 695–698. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200044>
- Deeba, E., Koptides, D., Lambrianides, A., Pantzaris, M., Krashias, G., & Christodoulou, C. (2019). Complete sequence analysis of human toll-like receptor 3 gene in natural killer cells of

- multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 33(May), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.05.027>
- Dermine, J.-F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G., & Desjardins, M. (2001). Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes* Downloaded from. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 276(21), 18507–18512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101113200>
- Dowlati, Y. (1996). Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 425–431. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00058-2](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00058-2)
- Dutta, S. K., & Tripathi, A. (2017). Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.08.009>
- Ehrchen, J. M., Roebrock, K., Foell, D., Nippe, N., von Stebut, E., Weiss, J. M., Münck, N. A., Viemann, D., Varga, G., Müller-Tidow, C., Schuberth, H. J., Roth, J., & Sunderkötter, C. (2010). Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, 6(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000871>
- El-Bendary, M., Neamatallah, M., Elalfy, H., Besheer, T., Elkholi, A., El-Diasty, M., Elsareef, M., Zahran, M., El-Aarag, B., Gomaa, A., Elhammady, D., El-Setouhy, M., Hegazy, A., & Esmat, G. (2018). The association of single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 8 genes with the susceptibility to HCV infection. *British Journal of Biomedical Science*, 75(4), 175–181. <https://doi.org/10.1080/09674845.2018.1492186>
- Engin, A., Arslan, S., Özbilüm, N., & Bakir, M. (2016). Is there any relationship between Toll-like receptor 3 c.1377C/T and -7C/A polymorphisms and susceptibility to Crimean Congo hemorrhagic fever? *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.24519>
- Eren, R. O., Reverte, M., Rossi, M., Hartley, M. A., Castiglioni, P., Prevel, F., Martin, R., Desponds, C., Lye, L. F., Drexler, S. K., Reith, W., Beverley, S. M., Ronet, C., & Fasel, N. (2016). Mammalian Innate Immune Response to a Leishmania-Resident RNA Virus Increases Macrophage Survival to Promote Parasite Persistence. *Cell Host and Microbe*, 20(3), 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.001>
- Eshleman, E. M., Delgado, C., Kearney, S. J., Friedman, R. S., & Lenz, L. L. (2017). Down regulation of macrophage IFNGR1 exacerbates systemic *L. monocytogenes* infection. *PLOS*

Pathogens, 13(5), e1006388. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006388>

- Fahey, T. J., Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L. S., Jones, W. G., Shires, G. T., Cerami, A., & Sherry, B. (1992). Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(9), 2764–2769. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1573267>
- Fairn, G. D., & Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends in Immunology*, 33(8), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.03.003>
- Fan, L., Zhou, P., Hong, Q., Chen, A.-X., Liu, G.-Y., Yu, K.-D., & Shao, Z.-M. (2019). *Toll-like receptor 3 acts as a suppressor gene in breast cancer initiation and progression: a two-stage association study and functional investigation*. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593801>
- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1792, Issue 6, pp. 497–505). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013>
- Ferro, C., López, M., Fuya, P., Lugo, L., Manuel Cordovez, J., & González, C. (2015). *Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139391>
- Filardy, A. A., Costa-Da-Silva, A. C., Koeller, C. M., Guimarães-Pinto, K., Ribeiro-Gomes, F. L., Lopes, M. F., Heise, N., Freire-De-Lima, C. G., Nunes, M. P., & DosReis, G. A. (2014). Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085715>
- Fischer, J., Koukouloti, E., Schott, E., Fülöp, B., Heyne, R., Berg, T., & Bömmel, F. van. (2018). Polymorphisms in the Toll-like receptor 3 (TLR3) gene are associated with the natural course of hepatitis B virus infection in Caucasian population. *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31065-6>
- Fox, J., & Bouchet-Valat, M. (2019). *Rcmdr: R Commander*. R package version 2.5-2. <https://cran.r-project.org/web/packages/Rcmdr/Rcmdr.pdf>
- Geng, P. L., Song, L. X., An, H., Huang, J. Y., Li, S., & Zeng, X. T. (2016). Toll-like receptor 3 is associated with the risk of HCV infection and HBV-related diseases. In *Medicine (United States)* (Vol. 95, Issue 21). Lippincott Williams and Wilkins.

<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002302>

- Gómez Gómez, J. L. (2021a). *Informe de Evento: Leishmaniasis cutánea*.
- Gómez Gómez, J. L. (2021b). *Informe de Evento: Leishmaniasis mucosa*.
- Gómez, M. A. (2021). *Dissecting the determinants of healing and non-healing responses in human cutaneous leishmaniasis*.
- Gorbea, C., Makar, K. A., Pauschinger, M., Pratt, G., F Bersola, J. L., Varela, J., David, R. M., Banks, L., Huang, C.-H., Li, H., Schultheiss, H.-P., Towbin, J. A., Vallejo, J. G., & Bowles, N. E. (2010). *A Role for Toll-like Receptor 3 Variants in Host Susceptibility to Enteroviral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy* * □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047464>
- Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419–433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>
- Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 82, pp. 155–184). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>
- Güven-Maiorov, E., Keskin, O., Gursoy, A., VanWaes, C., Chen, Z., Tsai, C.-J., & Nussinov, R. (2015). The Architecture of the TIR Domain Signalosome in the Toll-like Receptor-4 Signaling Pathway. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep13128>
- Guy, R. A., & Belosevic, M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infection and Immunity*, 61(4), 1553–1558. <https://doi.org/10.1128/iai.61.4.1553-1558.1993>
- Habibabadi, H. M., Parsania, M., Pourfathollah, A. A., Haghghat, S., & Sharifi, Z. (2020). Association of TLR3 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to HTLV-1 infection in Iranian asymptomatic blood donors. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 1–6. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0026-2020>
- Hamdy, S., Osman, A. M., Zakaria, Z. A., Galal, I., Sobhy, M., Hashem, M., Allam, W. R., Abdel-Samiee, M., Rewisha, E., Waked, I., & Abdelwahab, S. F. (2018). Association of Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 9 single-nucleotide polymorphisms with hepatitis C virus persistence among Egyptians. *Archives of Virology*, 163(9), 2433–2442. <https://doi.org/10.1007/S00705-018-3893-8>

- Hamilton, M. B. (2009). Populations Genetics. In *Evolution* (Vol. 23, Issue 4). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.2307/2406867>
- Handman, E., & Bullen, D. V. R. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18(8), 332–334. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8)
- Hartley, M. A., Bourreau, E., Rossi, M., Castiglioni, P., Eren, R. O., Prevel, F., Couppié, P., Hickerson, S. M., Launois, P., Beverley, S. M., Ronet, C., & Fasel, N. (2016). Leishmanivirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. *PLoS Pathogens*, 12(9), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005852>
- Hepburn, N. C. (2000). Cutaneous leishmaniasis. Clinical dermatology . Review article. *Clinical and Experimental Dermatology*, 25(5), 363–370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2000.00664.x>
- Herrer, A. (1971). *Leishmania hertigi* sp. n., from the Tropical Porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. *The Journal of Parasitology*, 57(3), 626. <https://doi.org/10.2307/3277928>
- Hidaka, F., Matsuo, S., Muta, T., Takeshige, K., Mizukami, T., & Nunoi, H. (2006). A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. *Clinical Immunology*, 119(2), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.005>
- Hol, J., Wilhelmsen, L., & Haraldsen, G. (2010). The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(3), 501–508. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809532>
- Ives, A., Masina, S., Castiglioni, P., Prével, F., Revaz-Breton, M., Hartley, M. A., Launois, P., Fasel, N., & Ronet, C. (2014). MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096766>
- Ives, A., Ronet, C., Prevel, F., Ruzzante, G., Fuertes-marraco, S., Schutz, F., Zangger, H., Revaz-breton, M., Lye, L., Hickerson, S. M., Beverley, S. M., Acha-orbea, H., Launois, P., Fasel, N., & Masina, S. (2011). *Leishmania* RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. *Science*, 331(11), 775–778.
- Jiang, S., Anderson, S. A., Winget, G. D., & Mukkada, A. J. (1994). Plasma membrane K⁺/H⁺-ATPase from *Leishmania donovani*. *Journal of Cellular Physiology*, 159(1), 60–66.

<https://doi.org/10.1002/jcp.1041590109>

- Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2001). The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 166(2), 1141–1147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1141>
- Kariyawasam, R., Grewal, J., Lau, R., Purssell, A., Valencia, B. M., Llanos-Cuentas, A., & Boggild, A. K. (2017). Influence of Leishmania RNA Virus 1 on Proinflammatory Biomarker Expression in a Human Macrophage Model of American Tegumentary Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 216(7), 877–886. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix416>
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 19(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.004>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue SEP, p. 461). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Killick-Kendrick, R., Wallbanks, K. R., Molyneux, D. H., & Lavin, D. R. (1988). The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis of *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology Research*, 74(6), 586–590. <https://doi.org/10.1007/BF00531639>
- Killick Kendrick, R., Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1974). *Leishmania* in phlebotomid sandflies I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 187(1089), 409–419. <https://doi.org/10.1098/rspb.1974.0085>
- Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). *Inmunología de Kuby* (6ta ed.). McGraw-Hill.
- Lainson, R., Shaw, J. J., Silveira, F. T., de Souza, A. A., Braga, R. R., & Ishikawa, E. A. (1994). The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3), 435–443. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300027>
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., & Michaeli, S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation. In *Eukaryotic Cell* (Vol. 2, Issue 5, pp. 830–840). American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/EC.2.5.830-840.2003>
- Llanos-Cuentas, A., Tulliano, G., Araujo-Castillo, R., Miranda-Verastegui, C., Santamaria-

- Castrellon, G., Ramirez, L., Lazo, M., De Doncker, S., Boelaert, M., Robays, J., Dujardin, J.-C., Arevalo, J., & Chappuis, F. (2008). Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Risk Factors for CL Treatment Failure*, 46(2), 231. <https://doi.org/10.1086/524042>
- Lodge, R., & Descoteaux, A. (2004). *Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania*. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.018>
- Lopes, M. F., Costa-Da-Silva, A. C., & Dosreis, G. A. (2014). Innate immunity to Leishmania infection: Within phagocytes. In *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2014/754965>
- Lorenzano, P. (2014). *What is the Status of the Hardy-Weinberg Law within Population Genetics?* 159–172. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01899-7_11
- Lumsden, W. H. R., & Evans, D. A. (1976). *Biology of the Kinetoplastida, voll* (W. H. R. Lumsden & D. A. Evans (eds.)). Academic press inc.
- Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(7), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.005>
- Matte, Christine, Casgrain, P.-A., Séguin, O., Moradin, N., Hong, W. J., & Descoteaux, A. (2016). Leishmania major Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63. *PLOS Pathogens*, 12(6), e1005690. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005690>
- Matte, Claudine, & Olivier, M. (2002). Leishmania- Induced Cellular Recruitment during the Early Inflammatory Response: Modulation of Proinflammatory Mediators. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(5), 673–681. <https://doi.org/10.1086/339260>
- McDowell, M. A., Marovich, M., Lira, R., Braun, M., & Sacks, D. (2002). Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infection and Immunity*, 70(8), 3994–4001. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.3994-4001.2002>
- Microsoft Corporation. (2016). *Microsoft Excel*. <https://office.microsoft.com/excel>
- Mineev, K., Goncharuk, S., & Arseniev, A. (2014). Toll-like receptor 3 transmembrane domain is able to perform various homotypic interactions: an NMR structural study. *FEBS Letters*, 588(21), 3802–3807. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.08.031>

- Misra, P., & Singh, S. (2019). Site specific microbiome of Leishmania parasite and its cross-talk with immune milieu. *Immunology Letters*, 216(October), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.004>
- Mosaad, Y. M., Metwally, S. S., Farag, R. E., Lotfy, Z. F., & AbdelTwab, H. E. (2019). Association between Toll-Like Receptor 3 (TLR3) rs3775290, TLR7 rs179008, TLR9 rs352140 and Chronic HCV. *Immunological Investigations*, 48(3), 321–332. <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1527851>
- Mougueau, E., Bihl, F., & Glaichenhaus, N. (2011). Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunological Reviews*, 240(1), 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x>
- Mukherjee, Saikat, & Tripathi, A. (2019). Contribution of Toll like receptor polymorphisms to dengue susceptibility and clinical outcome among eastern Indian patients. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.08.009>
- Mukherjee, Suprabhat, Huda, S., & Sinha Babu, S. P. (2019). Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scandinavian Journal of Immunology*, 90(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
- Müller, K., Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W., & Laskay, T. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology*, 190(1–2), 73–76. <https://doi.org/10.1007/s004300100084>
- Muñoz, G., & Davies, C. R. (2006). Leishmania panamensis transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. *Biomédica*, 26, 131–144. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V26I1.1507>
- Murray, H. W. (2002). Kala-azar - Progress against a neglected disease. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 347, Issue 22, pp. 1793–1794). <https://doi.org/10.1056/NEJMe020133>
- Murray, R. K., Kennelly, P. J., Bender, D. A., Rodwell, V. W., Botham, K. M., & Weil, P. A. (2013). *Harper, Bioquímica ilustrada* (2da edición). McGraw Hill.
- Nahum, A., Dadi, H., Bates, A., & Roifman, C. M. (2011). The L412F variant of Toll-like receptor 3 (TLR3) is associated with cutaneous candidiasis, increased susceptibility to cytomegalovirus, and autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 528–531. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.031>

- Nares, S., & Wahl, S. (2005). Monocytes and Macrophages. In *Measuring Immunity: Basic Biology and Clinical Assessment* (pp. 299–311). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012455900-4/50287-7>
- NCBI. (2018). *ClinVar*; [VCV000792634.2]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/792634/>
- NCBI. (2020). *TLR3 toll like receptor 3 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 7098*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7098>
- Ogg, M. M., Carrion, R., Botelho, A. C. de C., Mayrink, W., Correa-Oliveira, R., & Patterson, J. L. (2003). Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(3), 309–313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14628949>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & M, F. (2012). *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit* (38.1). *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Olivier, M. (2011). Host-pathogen interaction: Culprit within a culprit. *Nature*, 471(7337), 173–174. <https://doi.org/10.1038/471173a>
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). *Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas. Núm. 9, diciembre del 2020*. (Vol. 9). <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>
- Ovalle-Bracho, C., Camargo, C., Díaz-Toro, Y., & Parra-Muñoz, M. (2018). Molecular typing of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and species of the subgenus *Viannia* associated with cutaneous and mucosal leishmaniasis in Colombia: A concordance study. *Biomédica*, 38(1), 86–95. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V38I0.3632>
- Parra-Muñoz, M., Aponte, S., Ovalle-Bracho, C., Saavedra, C., & Echeverry, M. C. (2021). Detection of *Leishmania* RNA Virus in Clinical Samples from Cutaneous Leishmaniasis Patients Varies according to the Type of Sample. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(1), 233–239. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0073>
- Pauwels, A. M., Trost, M., Beyaert, R., & Hoffmann, E. (2017). Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation. In *Trends in Immunology* (Vol. 38, Issue 6, pp. 407–422). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.006>
- Pazmiño, Fredy A., Parra-Muñoz, M., Saavedra, C. H., Muvdi-Arenas, S., Ovalle-Bracho, C., & Echeverry, M. C. (2021). *Leishmania* RNA virus is associated with the occurrence of mucosal

leishmaniasis caused by species from the *Leishmania Viannia* subgenus. [Artículo Sometido Para Publicación En *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*].

Pazmiño, Fredy Alexander. (2020). *Determinación de la asociación entre la presencia del Leishmanivirus 1 (LRV-1) en parásitos infectantes de Leishmania spp y el desarrollo de la leishmaniasis mucosa en pacientes diagnosticados de leishmaniasis cutánea en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.

Perry, K., & Agabian, N. (1991). mRNA processing in the Trypanosomatidae. In *Experientia* (Vol. 47, Issue 2, pp. 118–128). Birkhäuser-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF01945412>

Phan, L., Jin, Y., Zhang, H., Qiang, W., Shekhtman, E., Shao, D., Revoe, ., Villamarin, R., Ivanchenko, E., Kimura, M., Wang, Z. Y., Hao, L., Sharopova, N., Bihan, M., Sturcke, A., Lee, M., Popova, N., Wu, W., Bastiani, C., ... Kattman, B. L. (2020). “ALFA: Allele Frequency Aggregator.” *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/>

Poirier, V., & Av-Gay, Y. (2015). Intracellular Growth of Bacterial Pathogens: The Role of Secreted Effector Proteins in the Control of Phagocytosed Microorganisms. *Microbiology Spectrum*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0003-2014>

Qi, R., Hoose, S., Schreiter, J., Sawant, K. V, Lamb, R., Ranjith-Kumar, C. T., Mills, J., San Mateo, L., Jordan, J. L., & Cheng Kao, C. (2010). Secretion of the Human Toll-like Receptor 3 Ectodomain Is Affected by Single Nucleotide Polymorphisms and Regulated by Unc93b1. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36635–36644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144402>

Raes, G., Beschin, A., Ghassabeh, G. H., & De Baetselier, P. (2007). Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.05.007>

Ranjith-Kumar, C. T., Miller, W., Sun, J., Xiong, J., Santos, J., Yarbrough, I., Lamb, R. J., Mills, J., Duffy, K. E., Hoose, S., Cunningham, M., Holzenburg, A., Mbow, M. L., Sarisky, R. T., & Kao, C. C. (2007). Effects of single nucleotide polymorphisms on toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17696–17705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700209200>

Rayamajhi, M., Humann, J., Penheiter, K., Andreasen, K., & Lenz, L. L. (2010). Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . *The Journal*

of Experimental Medicine, 207(2), 327. <https://doi.org/10.1084/JEM.20091746>

- Rodríguez, G., Arenas, C., Ovalle, C., Hernández, C. A., & Camargo, C. (2016). *La Leishmaniasis: Atlas y texto* (C. A. Hernández (ed.)). Hospital Universitario Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, E.S.E.
- Rogers, L. (1904). PRELIMINARY NOTE ON THE DEVELOPMENT OF TRYPANOSOMA IN CULTURES OF THE CUNNINGHAM-LEISHMAN-DONOVAN BODIES OF CACHEXIAL FEVER AND KALA-AZAR. *The Lancet*, 164(4221), 215–216. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)03458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)03458-4)
- Rogers, L. (1906). Further work on the development of the hepatomonas of Kala-Azar and cachexial fever from Leishman-Donovan bodies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 77(517), 284–293. <https://doi.org/10.1098/rspb.1906.0017>
- Ross, M. R. (1903). Further notes on leishman's bodies. *British Medical Journal*, 2(2239), 1401. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401>
- Rossi, M., Castiglioni, P., Hartley, M. A., Eren, R. O., Prével, F., Desponds, C., Utschneider, D. T., Zehn, D., Cusi, M. G., Kuhlmann, F. M., Beverley, S. M., Ronet, C., & Fasel, N. (2017). Type I interferons induced by endogenous or exogenous viral infections promote metastasis and relapse of leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(19), 4987–4992. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621447114>
- Rossi, M., & Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! *International Immunology*, 30(3), 103–111. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXX075>
- Saiz, M., Llanos-Cuentas, A., Echevarria, J., Roncal, N., Cruz, M., Muniz, M. T., Lucas, C., Wirth, D. F., Scheffter, S., Magill, A. J., & Patterson, J. L. (1998). SHORT REPORT: DETECTION OF LEISHMANIAVIRUS IN HUMAN BIOPSY SAMPLES OF LEISHMANIASIS FROM PERU. In *Am. J. Trop. Med. Hyg* (Vol. 58, Issue 2).
- Santos, C. N. O., Ribeiro, D. R., Cardoso Alves, J., Cazzaniga, R. A., Magalhães, L. S., De Souza, M. S. F., Fonseca, A. B. L., Bispo, A. J. B., Porto, R. L. S., Santos, C. A. Dos, Da Silva, Â. M., Teixeira, M. M., De Almeida, R. P., & De Jesus, A. R. (2019). Association between Zika Virus Microcephaly in Newborns with the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *Journal of Infectious Diseases*.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz392>

- Sassi, A., Louzir, H., Ben Salah, A., Mokni, M., Ben Osman, A., & Dellagi, K. (1999). Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clinical and Experimental Immunology*, *116*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00844.x>
- Scheffter, S. M., Ro, Y. T., Chung, I. K., & Patterson, J. L. (1995). The Complete Sequence of *Leishmania* RNA Virus LRV2-1, a Virus of an Old World Parasite Strain. *Virology*, *212*(1), 84–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1456>
- Scheffter, S., Widmer, G., & Patterson, J. L. (1994). Complete Sequence of *Leishmania* RNA Virus 1-4 and Identification of Conserved Sequences. *Virology*, *199*(2), 479–483. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1149>
- Schröder, N. W. J., & Schumann, R. R. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. In *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 5, Issue 3, pp. 156–164). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)01308-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)01308-3)
- Sghaier, I., Zidi, S., Mouelhi, L., Ghazoueni, E., Brochot, E., Almawi, W. Y., & Loueslati, B. Y. (2019). TLR3 and TLR4 SNP variants in the liver disease resulting from hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *British Journal of Biomedical Science*, *76*(1), 35–41. <https://doi.org/10.1080/09674845.2018.1547179>
- Sironi, M., Biasin, M., Cagliani, R., Forni, D., De Luca, M., Saulle, I., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Macías, J., Pineda, J., Caruz, A., & Clerici, M. (2012). Natural Resistance to HIV-1 Infection Confers TLR3 A Common Polymorphism in. *The Journal of Immunology*, *188*(2), 818–823. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102179>
- Software MacKiev. (2021). *GraphPad Prism* (9.1.2). www.graphpad.com
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 9, Issue 1, pp. 59–71). Journal of Cellular and Molecular Medicine. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x>
- Soriguer, F., & Morcillo, S. (2007). ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinología y Nutrición*, *54*(3), 169–173. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(07\)71425-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(07)71425-0)
- Stuart, K. D., Weeks, R., Guilbride, L., & Myler, P. J. (1992). Molecular organization of

- Leishmania RNA virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), 8596–8600. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8596>
- Studzińska, M., Jabłońska, A., Wiśniewska-Ligier, M., Nowakowska, D., Gaj, Z., Leśnikowski, Z. J., Woźniakowska-Gęsicka, T., Wilczyński, J., & Paradowska, E. (2017). Association of *TLR3 L412F* Polymorphism with Cytomegalovirus Infection in Children. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169420>
- Svensson, A., Tunbäck, P., Nordström, I., Padyukov, L., & Eriksson, K. (2012). Polymorphisms in Toll-like receptor 3 confer natural resistance to human herpes simplex virus type 2 infection. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042572-0>
- Tarr, P. I., Aline, R. F., Smiley, B. L., Scholler, J., Keithly, J., & Stuart, K. (1988). LR1: A candidate RNA virus of Leishmania. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9572–9275. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9572>
- Telleria, E. L., Martins-Da-Silva, A., Tempone, A. J., & Traub-Cseko, Y. M. (2018). Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 145(10), 1336–1353. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001014>
- Tripathi, P., Singh, V., & Naik, S. (2007). Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(2), 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x>
- Ueno, N., & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: Implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, 28(8), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>
- Ullah, M. O., Sweet, M. J., Mansell, A., Kellie, S., & Kobe, B. (2016). TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.2ri1115-531r>
- Ullah, M. O., Ve, T., Mangan, M., Alaidarous, M., Sweet, M. J., Mansell, A., & Kobe, B. (2013). The TLR signalling adaptor TRIF/TICAM-1 has an N-terminal helical domain with structural similarity to IFIT proteins. *Biological Crystallography*, 69, 2420–2430. <https://doi.org/10.1107/S0907444913022385>
- UniProt. (n.d.). *UniProtKB - O15455 (TLR3_HUMAN)*. Retrieved May 20, 2021, from <https://www.uniprot.org/uniprot/O15455>

- van Griensven, J., & Diro, E. (2012). Visceral Leishmaniasis. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 26, Issue 2, pp. 309–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>
- Vargas Córdoba, M. (2016). *Virología médica* (2da ed.). Universidad Nacional de Colombia y Manual Moderno.
- von Stebut, E., & Tenzer, S. (2018). Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(1), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.002>
- Wang, B. G., Yi, D. H., & Liu, Y. F. (2015). TLR3 gene polymorphisms in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Chinese Journal of Cancer*, 34(6). <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0020-z>
- Wang, Y., Liu, L., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2010). Dimerization of Toll-like Receptor 3 (TLR3) Is Required for Ligand Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36836. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.167973>
- Weeks, R., Aline, R. F., Myler, P. J., & Stuart, K. (1992). LRV1 viral particles in *Leishmania guyanensis* contain double-stranded or single-stranded RNA. *Journal of Virology*, 66(3), 1389–1393. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.3.1389-1393.1992>
- WHO. (2019). *Leishmaniasis - Number of cases of cutaneous leishmaniasis: 2018*. https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html
- WHO. (2021). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Widmer, G., Comeau, A. M., Furlong, D. B., Wirth, D. F., & Patterson, J. L. (1989). Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5979–5982. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5979>
- Widmer, G., & Dooley, S. (1995). Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. In *rNucleic Acids Research* (Vol. 23, Issue 12).
- Xia, D., Ye, S., Zhang, X., bao Zhang, Y., Tian, X., Liu, A., Cui, C., & Shi, L. (2020). Association of TLR3 (rs3775291) and IL-10 (rs1800871) gene polymorphisms with susceptibility to Hepatitis B infection: A meta-analysis. *Epidemiology and Infection*, 148, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0950268820002101>

- Yang, C. A., Raftery, M. J., Hamann, L., Guerreiro, M., Grütz, G., Haase, D., Unterwalder, N., Schönrich, G., Schumann, R. R., Volk, H. D., & Scheibenbogen, C. (2012). Association of TLR3-hyporesponsiveness and functional TLR3 L412F polymorphism with recurrent herpes labialis. *Human Immunology*, *73*(8), 844–851. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.008>
- Ye, N., Ding, Y., Wild, C., Shen, Q., & Zhou, J. (2014). Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(16), 6930–6948. <https://doi.org/10.1021/JM5004733>
- Zayed, R. A., Omran, D., Mokhtar, D. A., Zakaria, Z., Ezzat, S., Soliman, M. A., Mobarak, L., El-Sweesy, H., & Emam, G. (2017). Association of Toll-Like Receptor 3 and Toll-Like Receptor 9 Single Nucleotide Polymorphisms with Hepatitis C Virus Infection and Hepatic Fibrosis in Egyptian Patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, *96*(3), 720–726. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0644>
- Zhou, P., Fan, L., Yu, K.-D., Zhao, M.-W., & Li, X.-X. (2011). Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *The FASEB Journal*, *25*(10), 3489–3495. <https://doi.org/10.1096/FJ.11-189258>
- Zilberstein, & Dwyer. (1988). Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochemical Journal*, *256*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1042/bj2560013>
- Zilberstein, Philosoph, & Gepstein. (1989). Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *36*(2), 109–117. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90183-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90183-7)

11 ANEXO 1 – ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

11.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Sexo

Frecuencias absolutas observadas			Frecuencias esperadas		
	LM	LC		LM	LC
Femenino	9	18	Femenino	7,875	19,125
Masculino	19	50	Masculino	20,125	48,875

> *.Test* <- *chisq.test(.Table, correct=FALSE)*

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,31567, df = 1, p-value = 0,5742

Edad a la que adquirió LC

	<i>n</i>	Media	SD	Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test
LC	68	26,79412	15,77695	D = 0,13914 p-value = 0,002284
LM	21	30,95238	13,03256	D = 0,13754 p-value = 0,3765

> *wilcox.test(Edad.a.la.que.adquirió.LC ~ Grupo, + alternative="two.sided", data=Dataset)*

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

W = 877, p-value = 0,116

alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

Tratamiento para LC

Frecuencias absolutas observadas			Frecuencias esperadas		
	LM	LC		LM	LC
Si	9	0	Femenino	2,680851	6,319149

No	19	66
----	----	----

Masculino	25,319149	59,680851
-----------	-----------	-----------

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,000006493

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

Tipo de tratamiento

Frecuencias absolutas observadas

	LM	LC
Antimonio de meglumina	7	62
Miltefosina	1	0
Ketoconazol	1	2

Frecuencias esperadas

	LM	LC
Antimonio de meglumina	8,5068493	60,4931507
Miltefosina	0,1232877	0,8767123
Ketoconazol	0,3698630	2,6301370

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,07173

alternative hypothesis: two.sided

Falla Terapéutica

Frecuencias absolutas observadas

	LM	LC
Si	1	20
No	8	44

Frecuencias esperadas

	LM	LC
Femenino	2,589041	18,41096
Masculino	6,410959	45,58904

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,4317

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,005911374 – 2,324914977

sample estimates:

odds ratio

0,2787928

Especie de *Leishmania*

Frecuencias absolutas observadas

	LM	LC
<i>Leishmania</i> spp.	3	19
<i>L. braziliensis</i>	19	37
<i>L. panamensis</i>	5	11
<i>L. guyanensis</i>	1	1

Frecuencias esperadas

	LM	LC
<i>Leishmania</i> spp.	6,4166667	15,5833333
<i>L. braziliensis</i>	16,3333333	39,6666667
<i>L. panamensis</i>	4,6666667	11,3333333
<i>L. guyanensis</i>	0,5833333	1,4166667

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,2538

alternative hypothesis: two.sided

LRV1

Frecuencias absolutas observadas

	LM	LC
Si	10	5
No	18	63

Frecuencias esperadas

	LM	LC
Femenino	4,375	10,625
Masculino	23,625	57,375

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,001192

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

1,847288 – 28,932826

sample estimates:

odds ratio

6,823663

11.2 POLIMORFISMOS DE TLR3 EN POBLACIÓN COLOMBIANA

Equilibrio Hardy-Weinberg

rs3775296

Genotipo	F. Observadas	F. Esperadas	Genotipo	[(O-E) ²]/E
CC	35	34,24	CC	0,017
CA	16	17,52	CA	0,132
AA	3	2,24	AA	0,257

Chi² calculada 0,406

Chi² tabulada (df=1) 3,840

***P* 0,5072**

rs764010322

Genotipo	F. Observadas	F. Esperadas	Genotipo	[(O-E) ²]/E
AA	46	44,06	AA	0,085
AG	0	7,66	AG	7,663
GG	4	0,33	GG	40,353

Chi² calculada 48,102

Chi² tabulada (df=1) 3,840

***P* 0**

rs3775291

Genotipo	F. Observadas	F. Esperadas	Genotipo	[(O-E) ²]/E
CC	25	24,45	CC	0,013
CT	24	25,11	CT	0,049
TT	7	6,45	TT	0,048

Chi ² calculada	0,109
Chi ² tabulada (df=1)	3,840
P	0,7414

rs3775290

Genotipo	F. Observadas	F. Esperadas	Genotipo	[(O-E) ² /E
CC	23	22,22	CC	0,027
CT	20	21,55	CT	0,112
TT	6	5,22	TT	0,115

Chi ² calculada	0,254
Chi ² tabulada (df=1)	3,840
P	0,6143

Muestra de estudio vs Población Latinoamericana

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas			Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población latinoamericana		Muestra	Población latinoamericana
C	48,5	1227,268	C	49,57648	1226,1915
A	11,5	256,732	A	10,42352	257,8085

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,13999, df = 1, p-value = 0,7083

rs764010322

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población latinoamericana
A	46	11576,958
G	4	1,04202

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población latinoamericana
A	49,97831949	11572,979681
G	0,02168051	5,020339

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 733,48, df = 1, p-value < 2,2e-16

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población latinoamericana
C	36,3392857	3647,28
T	18,6607143	1362,72

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población latinoamericana
C	39.99981	3643.619
T	15.00019	1366.381

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 1,2418, df = 1, p-value = 0.2651

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población latinoamericana
C	32,83	569,328
T	16,17	103,008
A	0	23,664

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población latinoamericana
C	39.605023	562.55298
T	7.838553	111.33945
A	1.556424	22.10758

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 12,385, df = 2, p-value = 0.002044

Muestra de estudio vs Población Europea

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población Europea
C	48,5	2586663,35
A	11,5	598882,648

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población Europea
C	48,72	2586663,1
A	11,28	598882,9

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,0052841, df = 1, p-value= 0.9421

rs764010322

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población Europea
A	46	773328,799
G	4	23,20056

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población Europea
A	49,99824	773324,8008
G	0,00175	27,1988

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 9091,6, df = 1, p-value < 2,2e-16

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	36,3392857	213989,104
T	18,6607143	88682,896

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	38,88454	213986,56
T	16,11546	88685,44

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,5687, df = 1, p-value = 0,4508

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	32,83	125935,56
T	16,17	12861,504
A	0	39834,936

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	34,544530	125933,85
T	3,531467	12874,14
A	10,924003	39824,01

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 56,256, df = 2, p-value = 6,084e-13

Muestra de estudio vs Población Africana

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Africana
C	48,5	94066,556
A	11,5	17651,444

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Africana
C	50,518916	94064,54
A	9,481084	17653,46

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,51087, df = 1, p-value = 0,4748

rs764010322

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población Africana
A	46	110404
G	4	0

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población Africana
A	49,9981	110400,0018
G	0,0018	3,9981

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-X-squared = 8832,6, df = 1, p-value < 2,2e-16

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población Africana
C	36,3392857	11330,376
T	18,6607143	697,624

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población Africana
C	51,73958	11314,9757
T	3,26042	713,0243

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 77,679, df = 1, p-value < 2,2e-16

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Africana
C	32,83	3640,59
T	16,17	332,124
A	0	285,286

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Africana
C	41,791869	3631,6281
T	3,962481	344,3315
A	3,245650	282,0404

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 43,68, df = 2, p-value = 4,022e-10

Muestra de estudio vs Población Asiatica

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	48,5	2586663,35
A	11,5	598882,648

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	48,72	2586663,1
A	11,28	598882,9

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,0052841, df = 1, p-value= 0.9421

rs764010322

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Europea
A	46	773328,799
G	4	23,20056

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Europea
A	49,99824	773324,8008
G	0,00175	27,1988

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 9091,6, df = 1, p-value < 2,2e-16

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	36,3392857	213989,104
T	18,6607143	88682,896

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	38,88454	213986,56
T	16,11546	88685,44

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,5687, df = 1, p-value = 0,4508

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	32,83	125935,56
T	16,17	12861,504
A	0	39834,936

Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población
		Europea
C	34,544530	125933,85
T	3,531467	12874,14
A	10,924003	39824,01

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 56,256, df = 2, p-value = 6,084e-13

Muestra de estudio vs Población Africana

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas

	Muestra	Población Asiática
C	48,5	5376,208
A	11,5	1587,792

Frecuencias esperadas

	Muestra	Población Asiática
C	46.33862	5378.369
A	13.66138	1585.631

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0.44658, df = 1, p-value = 0.504

rs764010322

Frecuencias absolutas observadas

	Muestra	Población Asiática
A	46	2516622
G	4	0

Frecuencias esperadas

	Muestra	Población Asiática
A	49,9999	2516618
G	0,0000	3,9999

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 201330, df = 1, p-value < 2,2e-16

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas

	Muestra	Población Asiática
C	36,3392857	4824,562
T	18,6607143	2157,438

Frecuencias esperadas

	Muestra	Población Asiática
C	37,99198	4822,909
T	17,00802	2159,091

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,23432, df = 1, p-value = 0,6283

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas			Frecuencias esperadas		
	Muestra	Población		Muestra	Población
		Asiática			Asiática
C	32,83	4185,688	C	32,7327604	4185,78524
T	16,17	2055,248	T	16,0727604	2055,34524
A	0	25,064	A	0,1944792	24,86952

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,19688, df = 2, p-value = 0,9062

11.3 EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE TLR3 Y EL DESARROLLO DE LEISHMANIASIS MUCOSA

Frecuencias alélicas

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas			Frecuencias esperadas		
	LC	LM		LC	LM
C	97	31	C	94,81481	33,185185
A	23	11	A	25,18519	8,814815

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,92555, df = 1, p-value= 0,336

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,5877394 - 3,6300951

sample estimates:

odds ratio

1,492562

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
C	72	31
T	38	23

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
C	69,08537	33,91463
T	40,91463	20,08537

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 1,004, df = 1, p-value = 0,3163

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,6801335 - 2,8813282

sample estimates:

odds ratio

1,402761

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
C	66	33
T	32	15

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
C	66.45205	32.54795
T	31.54795	15.45205

> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)

Pearson's Chi-squared test

X-squared = 0,029056, df = 1, p-value = 0,8646

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,4117003 - 2,0816301

sample estimates:

odds ratio

0,9378944

Frecuencias Genotipicas

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
CC	40	10
CA	17	11
AA	3	0

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
CC	37,037037	12,9629630
CA	20,740741	7,2592593
AA	2,222222	0,7777778

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,1253

alternative hypothesis: two.sided

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
CC	24	8
CT	24	15
TT	7	4

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
CC	21,463415	10,536585
CT	26,158537	12,841463
TT	7,378049	3,621951

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,4432

alternative hypothesis: two.sided

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM

Frecuencias esperadas		
	LC	LM

CC	23	11
CT	20	11
TT	6	2

CC	22,821918	11,178082
CT	20,808219	10,191781
TT	5,369863	2,630137

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,8825

alternative hypothesis: two.sided

11.4 EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE TLR3 Y EL DESARROLLO DE LEISHMANIASIS MUCOSA EN EL CONTEXTO DE COINFECCIÓN LEISHMANIA SPP. - LRV1

Frecuencias alélicas

rs3775296

	Frecuencias absolutas observadas	
	LC	LM
C	9	6
A	1	2

	Frecuencias esperadas	
	LC	LM
C	8.333333	6.666667
A	1.666667	1.333333

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,5588

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,1209184 - 195,9869863

sample estimates:

odds ratio

2,819345

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
C	7	12
T	3	8

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
C	6.333333	12.666667
T	3.666667	7.333333

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

p-value = 0,702

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,2465195 - 11,9826442

sample estimates:

odds ratio

1,533185

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
C	7	12
T	3	8

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
C	6.333333	12.666667
T	3.666667	7.333333

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

Pearson's Chi-squared test

p-value = 0,702

alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1

95 percent confidence interval:

0,2465195 - 11,9826442

sample estimates:

odds ratio

1,533185

Frecuencias Genotípicas

rs3775296

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
CC	4	2
CA	1	2
AA	0	0

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
CC	3,333333	2,666667
CA	1,666667	1,333333
AA	0	0

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,5238

alternative hypothesis: two.sided

rs3775291

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
CC	2	3
CT	3	6
TT	0	1

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
CC	1,6666667	3,3333333
CT	3	6
TT	0,3333333	0,6666667

> *fisher.test(.Table)*

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 1

alternative hypothesis: two.sided

rs3775290

Frecuencias absolutas observadas		
	LC	LM
CC	3	4
CT	1	4
TT	1	2

Frecuencias esperadas		
	LC	LM
CC	2,333333	4,666667
CT	1,666667	3,333333
TT	1	2

```
> fisher.test(.Table)
```

Fisher's Exact Test for Count Data

p-value = 0,7902

alternative hypothesis: two.sided

12 ANEXO 2 – IDENTIFICACIÓN DE SNPs EN ELECTROFEROGRAMAS

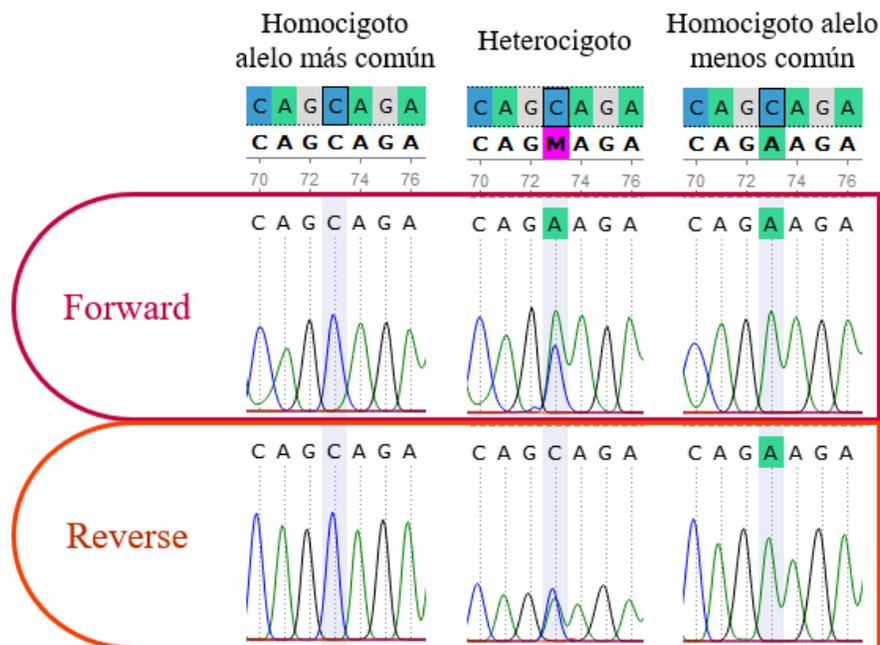


Figura Suplementaria 1 Definición de genotipos variación rs3775296. Se presenta un ejemplo de cada uno de los tres posibles genotipos reportados para la variación: homocigoto para el alelo más común C (izquierda), heterocigoto (centro) y homocigoto para el alelo menos común A (derecha).

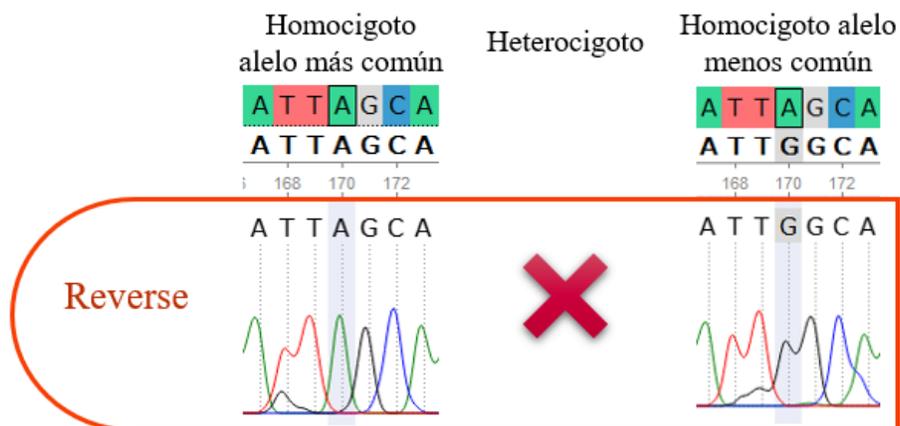


Figura Suplementaria 2 Definición de genotipos variación rs76401032. Se presenta un ejemplo de cada uno de los dos genotipos evidenciados para la variación: homocigoto para el alelo más común A (izquierda) y homocigoto para el alelo menos común G (derecha). Para esta variación no se reportaron heterocigotos.

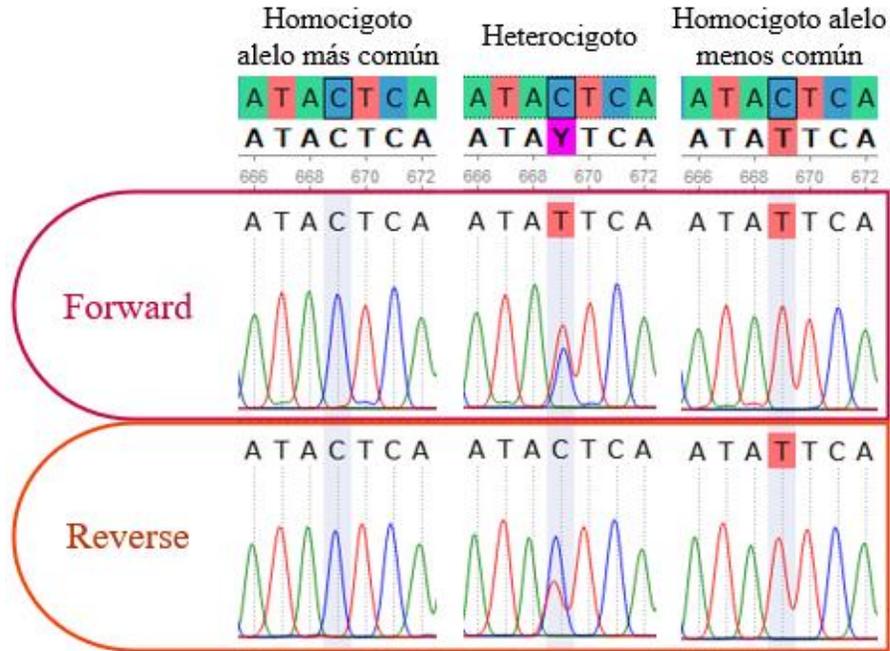


Figura Suplementaria 3 Definición de genotipos variación rs3775291. Se presenta un ejemplo de cada uno de los tres posibles genotipos reportados para la variación: homocigoto para el alelo más común C (izquierda), heterocigoto (centro) y homocigoto para el alelo menos común T (derecha).

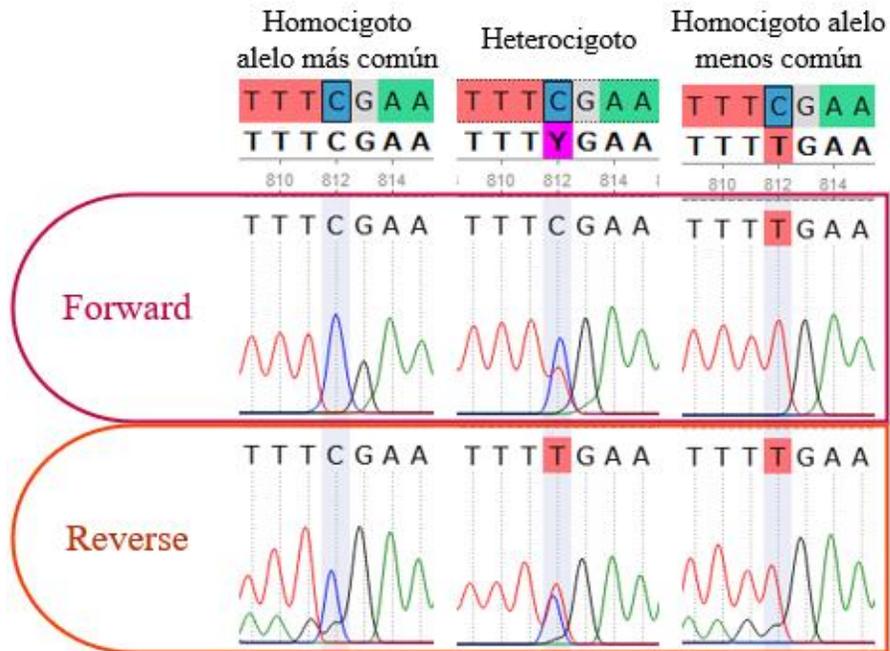


Figura Suplementaria 4 Definición de genotipos variación rs3775290. Se presenta un ejemplo de cada uno de los tres posibles genotipos reportados para la variación: homocigoto para el alelo más común C (izquierda), heterocigoto (centro) y homocigoto para el alelo menos común T (derecha).