



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania spp*
en leishmaniasis mucocutánea: utilidad diagnóstica.**

Magda Melissa Flórez Martínez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2014

**Péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania*
spp en leishmaniasis mucocutánea: utilidad diagnóstica.**

Magda Melissa Flórez Martínez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director (a):

Ph.D. Lucy Gabriela Delgado Murcia

Codirectora:

Ph.D. Concepción Puerta Bula

Línea de Investigación:

Respuesta inmune a agentes infecciosos

Grupo de Investigación en Inmunotoxicología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2014

*Dale vida a los sueños que alimentan el alma,
no los confundas nunca con realidades vanas.
Y aunque tu mente sienta necesidad, humana,
de conseguir las metas y de escalar montañas,
nunca rompas tus sueños, porque matas el alma.*

*Dale vida a tus sueños aunque te llamen loco,
no los dejes que mueran de hastío, poco a poco,
no les rompas las alas, que son de fantasía,
y déjalos que vuelen contigo en compañía.*

*Dale vida a tus sueños y, con ellos volando,
tocarás las estrellas y el viento, susurrando,
te contará secretos que para ti ha guardado
y sentirás el cuerpo con caricias, bañado,
del alma que despierta para estar a tu lado.*

*Dale vida a los sueños que tienes escondidos,
descubrirás que puedes vivir estos momentos
con los ojos abiertos y los miedos dormidos,
con los ojos cerrados y los sueños despiertos*

Mario Benedetti

A mi familia y amigas

Agradecimientos

Al final de este proceso de mi formación profesional quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron a su desarrollo.

Principalmente quiero agradecer a mi mamá (Consuelo Martínez), papá (Alvaro Flórez) y hermanos (Nathaly Sofía y Alvaro Javier) quienes siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional en todas las etapas y situaciones durante este proceso.

A mi directora de tesis Gabriela Delgado por depositar su confianza en mí y por brindarme todas las herramientas posibles para que el desarrollo de este proceso llegara a buen término, además por todas sus enseñanzas académicas y personales.

A la Universidad Nacional de Colombia y su programa de Maestría en Ciencias-Microbiología por abrirme sus puertas y permitir mi aprendizaje. A su directora, Martha Fontanilla y a su asistente Socorro Prieto por todo su apoyo en todo el desarrollo de la maestría.

A las Integrantes del Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Diana Susana Granados y Elaine Torres quienes hacen aún más divertido el trabajo diario en el laboratorio y quienes con sus aportes fortalecieron el desarrollo del proyecto.

A Yohana Dominguez por su acompañamiento en las etapas iniciales del trabajo en laboratorio. A Vanessa Otero y su grupo FAMETRA por su apoyo y la disponibilidad de sus equipos.

Al Instituto Nacional de Salud y la doctora Martha Ayala; al Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia y la doctora Concepción Puerta; al Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes CREA y la doctora Gladis Montoya; al Grupos de investigación, Núcleo de Biotecnología Curauma de la Universidad Católica de Valparaíso y la doctora Fanny Guzmán; todos ellos por sus valiosos aportes en materiales para el desarrollo de este trabajo.

Al Centro de pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, (CPqGM-FIOCRUZ) Brasil, especialmente al a doctora Camila Indiani de Oliveira quien permitió mi pasantía en su grupo y un avance significativo en su desarrollo. A Juqueline Cristal por todo su acompañamiento en la etapa experimental. A Petter Entringer por toda su hospitalidad en mi pasantía por Brasil.

A mis amigas Sandra Camargo, Stefany Lozada y Camila Flechas por su acompañamiento incondicional, por toda su confianza en que este proceso era posible, por todas aquellas tardes de café y locura y especialmente por su existencia en mi vida. A Indira Hernández quien fue promotora de mi formación en investigación. A Diana Villalobos y Sandy Alarcón por su acompañamiento y apoyo constante durante los últimos años.

A Colciencias por la financiación en el marco del programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda" 2012.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y su apoyo financiero con el proyecto código Hermes 16015.

Resumen

Los métodos diagnóstico-serológicos disponibles en la actualidad para la leishmaniasis mucocutánea (LMC) están basados en la detección de anticuerpos dirigidos contra la totalidad del parásito, lo que limita el reconocimiento específico de antígenos inmunogénicos, que a su vez puedan ser empleados como marcador diagnóstico y/o pronóstico de esta enfermedad. El ELISA empleando lisado de parásitos de *Leishmania*, es una técnica más sensible que la IFI pero menos específica, por lo tanto se han empleado fracciones proteicas o proteínas únicas, con el fin de aumentar dicha especificidad. Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania braziliensis* como candidatos a antígenos para el diagnóstico de la LMC por ELISA. Se utilizaron 8 y 12 péptidos derivados de las secuencias de las proteínas ribosomales S25 y S5 respectivamente como antígenos para la detección de anticuerpos séricos por ELISA en individuos con LMC. En este estudio se observó que con el método convencional empleando Antígeno soluble de *Leishmania* (ASL) de *L. braziliensis* la sensibilidad para la detección de LMC fue del 84% y para LC del 75% pero la especificidad, fue de 52,5%. De los 21 péptidos evaluados, P4 y P6 derivados de la proteína S25 y los péptidos P19 y P21 derivados de la proteína S5 presentaron los mejores resultados arrojando una sensibilidad del 21,7%, 13,04%, 20% y 20% respectivamente, además de una especificidad de 95%, 100%, 100% y 82,5% respectivamente. Podemos concluir entonces que la utilidad de los péptidos en estudio como herramienta diagnóstica es limitada bajo las condiciones usadas, y se hace necesario aumentar la sensibilidad en la detección de anticuerpos.

Palabras clave: Leishmaniasis mucocutánea, diagnóstico, péptidos sintéticos, proteínas ribosomales

Abstract

Serological methods currently available to diagnosis mucocutaneous leishmaniasis (MCL) are based on the detection of antibodies against the whole parasite, limiting the specific recognizing of immunogenic antigens that in turn out could be used as diagnosis and/or prognosis markers to this disease. The ELISA using *Leishmania* parasites lisate is a technique more sensitive than IFI but less specific, therefore, it's been used proteic fractions or single proteins in order to rise that specificity. Considering this background, the aim of this work was to evaluate synthetic peptides derived from *Leishmania braziliensis* ribosomal proteins as candidates to be antigens to the diagnosis of MCL by ELISA. It was used 8 and 12 peptides derived from ribosomal proteins S25 and S5 respectively as antigens in order to detect seric antibodies by ELISA in people with MCL. Using conventional method, the sensitivity to LMC patients was 84% and to LC patients was 75% but sensitivity of this technic was just 52.5%. After evaluate all peptides, P4, P6 derived from ribosomal protein S25 and P 19 and 21 derived from ribosomal protein S5 presented better results, showing a sensitivity of 21.7%, 13.04% 20% and 20% respectively, besides it was found a specificity of 95%, 100%,100% and 82.5% respectively. We may conclude that the usefulness of these peptides as a tool for diagnostic of leishmaniasis is not desirable with the used conditions, and it is necessary to rise the sensibility in the detection of antibodies.

Key words: Mucocutaneous leishmaniasis, diagnosis, synthetic peptides, ribosomal proteins.

Contenido

INTRODUCCIÓN	16
1. Marco teórico	20
1.1. Leishmaniasis	20
1.1.1. Epidemiología.....	20
1.1.2. Agente etiológico.....	21
1.1.3. Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA).....	22
1.1.4. Leishmaniasis cutánea (LC):	22
1.1.5. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	22
1.1.6. Otras formas de presentación de LTA:.....	23
1.2. Respuesta inmune primaria ante la infección por Leishmania	24
1.3. Respuesta inmune humoral	24
1.4. Diagnóstico de LMC	25
1.4.1. Métodos parasitológicos.....	26
1.4.2. Métodos serológicos	26
1.4.3. Fracciones antigénicas:.....	27
1.4.4. Proteínas altamente conservadas:	28
2. Objetivos	31
2.1. General	31
2.2. Específicos:	31
3. METODOLOGÍA	32
3.1. Antígenos:	32
3.1.1. Péptidos ribosomales.....	32
3.1.2. Antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (ASL)	34
3.2. Muestras de sueros:	35
3.3. Ensayo de Inmunoabsorción acoplado a Enzimas (ELISA):	36
3.3.1. Protocolo 1	36
3.3.2. Protocolo 2	36
3.4. ELISA péptidos ribosomales	37
3.5. Detección de Subclases de IgG:	37
3.6. Análisis de datos	37
4. ELISA convencional	39
4.1. ELISA convencional de sueros de pacientes con leishmaniasis:	39
4.2. Discusión	47
5. Péptidos ribosomales	50
5.1. ELISA basado en péptidos	50
5.2. Discusión	54
6. Determinación de subclases de IgG	57
6.1. ELISA convencional para subclases	57
6.2. Discusión	58
7. Conclusiones	60

8. Bibliografía	61
9. Anexos	68
9.1. Anexo 1 consentimiento informado.....	68
9.2. Anexo 2. Aprobación del comité de ética.....	71

Lista de Gráficas

Gráfica 1	41
Gráfica 2	42
Gráfica 3: ELISA de sueros de pacientes con Leishmaniasis empleando ASL.....	45
Gráfica 4.....	45
Gráfica 5.....	46
Gráfica 6.....	50
Gráfica 7.....	51
Gráfica 8.....	52
Gráfica 9.....	53
Gráfica 10.....	57
Gráfica 11.....	58

Lista de ilustraciones

Ilustración 1: Secuencia S25..... 32
Ilustración 2: Secuencia de S5..... 33

Lista de tablas.

Tabla 1: Péptidos derivados de proteína S25	33
Tabla 2: Péptidos derivados de proteína S5	34
Tabla 3: Características del ELISA con ASL de <i>Leishmania spp.</i> protocolo 1	42
Tabla 4: características del ELISA con ASL de <i>Leishmania spp.</i> protocolo 2.....	43
Tabla 5 Diferencias entre protocolo 1 y 2.....	46
Tabla 6: Características del ELISA basado en péptidos.....	54

Lista de Símbolos y abreviaturas

Leishmania (Viannia) *panamensis**L. panamensis*
Leishmania (Viannia) *braziliensis**L. braziliensis*
Leishmania (Viannia) *guyanensis**L. guyanensis*
Leishmania (*Leishmania*) *major**L. major*

Aminoácidos

A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Ácido aspártico
C	Cisteína
Q	Glutamina
E	Ácido glutámico
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina
W	Triptófano

Y	Tirosina
V	Valina
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LC	Leishmaniasis cutánea
LV	leishmaniasis visceral
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción acoplado a Enzimas
LTA	Leishmaniasis Tegumentaria Americana
Ig	Inmunoglobulina
HSPs	proteínas de choque térmico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
IMT	Inmunotoxicología
ASL	Antígeno Soluble de <i>Leishmania</i>
INS	Instituto Nacional de Salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
pNPP	Para-Nitrofenil Fosfato
TMB	Tetrametil Benzidina
MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis
VPP	Valor Predictivo Positivo
VPN	Valor Predictivo Negativo
ND	No determinado
VP	Verdadero Positivo
VN	Verdadero Negativo
FP	Falso Positivo
FN	Falso Negativo
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxidasa de Rábano)
ALP	Alkaline Phosphatase (Fosfatasa Alcalina)

Contenido

EAI Enfermedades Autoinmunes

INTRODUCCIÓN

La transmisión de la *Leishmania spp.* se restringe a las zonas tropicales y subtropicales del globo, donde habita el parásito concomitantemente con su insecto vector, al cual se ha adaptado. El parásito subsiste entonces pasando del vector a vertebrados (animales y humanos) y viceversa en el momento de la ingesta de sangre por dicho insecto ^{1; 2}.

Se han reportado casos de Leishmaniasis en por lo menos 98 países a lo largo del viejo y del nuevo mundo, con una incidencia anual estimada de 2 millones de casos¹. En Colombia esta enfermedad es endémica, presentándose casos en más del 90% del territorio nacional^{3; 4; 5}.

A pesar que la leishmaniasis mucocutánea (LMC) constituye solamente alrededor del 1% de los casos en Colombia⁴, las lesiones que genera esta forma clínica son severas abarcando desde síntomas leves, hasta perforación y destrucción total de la mucosa nasofaríngea dejando secuelas irreversibles en los afectados como desfiguraciones físicas, discapacidades y estigmas psicológicos y sociales^{1; 6}. Las especies responsables de la LMC son principalmente *Leishmania (L.) L. braziliensis* y *L. (V) guyanensis*, aunque otras especies también pueden tener capacidad de afectar el tejido nasofaríngeo^{7; 8}. La LMC se presenta debido a la migración de los parásitos desde el sitio de la infección primaria (piel) hasta la mucosa de la cavidad naso-orofaríngea. Esta forma puede aparecer concomitantemente con la lesión cutánea o surgir semanas, meses o años después de la cicatrización de la forma cutánea localizada. Las lesiones se manifiestan inicialmente con nódulos e infiltraciones en la parte anterior del tabique nasal. A medida que la enfermedad progresa, el compromiso de tejidos es mayor afectando la faringe, el paladar, la

laringe, la tráquea y el labio superior. En los estados más avanzados de la LMC se presentan mutilaciones severas con destrucción de la nariz, la faringe, la laringe y perforación del paladar. Posteriores complicaciones como la neumonía por sobreinfecciones bacterianas, son la causa de muerte más frecuente en estos pacientes. En adición, sin tratamiento y a diferencia de los afectados con la forma cutánea, estos pacientes no curan espontáneamente la LMC, por lo tanto es indispensable un diagnóstico certero y oportuno de esta entidad¹.

El diagnóstico de la LMC se basa principalmente en la presentación clínica de la misma y es soportada con exámenes de laboratorio confirmatorios. Dentro de los métodos diagnósticos se encuentra la observación directa del parásito ya sea a través de tinción de muestras de las lesiones o de cultivos *in vitro* o *in vivo* de las mismas (métodos parasitológicos). A pesar que los métodos parasitológicos son 100% específicos, su sensibilidad en casos de LMC es tan baja como 15% debido a la gran reacción inflamatoria y el escaso número de parásitos en la lesión^{9; 10}.

Como alternativa diagnóstica existen los métodos serológicos, que se basan en la detección de anticuerpos (específicos para el antígeno frente al cual fueron inducidos) como una medida indirecta de la presencia de parásitos en las lesiones; estos métodos son ampliamente usados para la LMC y presentan sensibilidades mayores que las herramientas de detección parasitológicas. Dentro de las técnicas más ampliamente usadas está la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) que presenta una sensibilidad del 70% al 80% y el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) que muestra sensibilidades de ~80-95%^{11; 12}. Estos parámetros presentan gran variabilidad dependiendo del antígeno utilizado para la prueba y de la especie responsable de la infección^{12; 13}.

Debido a que la *Leishmania* comparte características estructurales con otros organismos, es común encontrar reacciones cruzadas en las pruebas serológicas con otros microorganismos; en consecuencia, la especificidad de las mismas es baja cuando se detectan anticuerpos policlonales dirigidos a los la totalidad del

parásito. Así, la especificidad de la IFI se encuentra alrededor de 85% y del ELISA alrededor de ~60-80%^{11; 12; 14; 15; 16}. Para el caso de la leishmaniasis (en todas sus formas) y dada la cercanía filogenética con *Trypanosoma spp*, se ha encontrado reacción cruzada en pacientes con enfermedad de Chagas hasta en un 80%^{15; 17}.

Con el fin de disminuir el número de falsos positivos e incrementar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas, se ha modificado e implementado el uso de fracciones de estos parásitos o proteínas específicas, en lugar de utilizar parásitos completos como antígenos. Esta estrategia involucra la identificación de proteínas inmunogénicas o antígenicas que sean específicas para el género *Leishmania*. Entre éstas, se han estudiado las proteínas ribosomales en pruebas de inmunodiagnóstico para la leishmaniasis visceral canina (causada por *L. infantum*) con resultados prometedores, especialmente cuando se selecciona cierta fracción proteica en lugar de la proteína completa^{18; 19; 20; 21}.

Considerando estudios previos antes relacionados, y luego de analizar la homología de estas proteínas con su contraparte en especies responsables de la patología en humanos, para la realización de este estudio se seleccionaron 2 proteínas ribosomales S25 y S5 identificadas en *L. braziliensis*, pertenecientes a la subunidad ribosomal 40S. Si bien estas proteínas forman parte del ribosoma de *L. braziliensis*, presentan una homología de más del 90% con otras especies de *Leishmania* de interés clínico, por tanto en este trabajo se buscó determinar la utilidad de péptidos sintéticos derivados de estas proteínas ribosomales como antígeno para el diagnóstico serológico de la LMC por ELISA.

Con este fin, se seleccionaron 8 péptidos de la proteína S25 abarcando la totalidad de su secuencia lineal y 13 péptidos derivados de la secuencia de la proteína S5, para un total de 21 péptidos. Se determinó entonces la presencia de anticuerpos dirigidos contra cada uno de estos péptidos en el suero de pacientes con diagnóstico confirmado de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, además de pacientes con

enfermedad de Chagas y enfermedades autoinmunes para determinar la reactividad cruzada de los mismos.

En la realización de este trabajo se pudo observar que cuando se realiza el ELISA con antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* la sensibilidad de la prueba para detectar casos de LMC, es del 84% y para LC del 75% similar a la sensibilidad con antígenos de otras especies evaluadas (*L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*). Se evidenció reacción cruzada con sueros de pacientes con enfermedad de CH y EAI arrojando una especificidad de 52.5%. De los 21 péptidos evaluados, la mayoría no permitió identificar individuos con leishmaniasis, sin embargo los péptidos P4, P6 y P12 presentaron los mejores resultados exhibiendo una sensibilidad del 21,7%, 13,04% y 5% respectivamente. Como resultado relevante se evidenció que a pesar de la baja sensibilidad, estos 3 péptidos (P4, P6 y P12) presentaron una especificidad de 95%, 100% y 100% respectivamente. Finalmente, las subclase IgG3 mostró ser más prevalentes que las demás subclases de IgG cuando se monitorearon por medio del ELISA con lisado de parásitos completos (ASL).

1. Marco teórico

1.1. Leishmaniasis.

1.1.1. Epidemiología

La leishmaniasis se encuentra distribuida mundialmente y es endémica en 98 países. A pesar que la mayoría de infectados son asintomáticos, se reportan anualmente alrededor de 2 millones de nuevos casos, se estima que hay 10 millones de personas infectadas y 350 mil están en riesgo de adquirir la enfermedad¹. La leishmaniasis cobra la vida de alrededor de 59.000 personas al año. En el continente americano se presentan alrededor de 64.000 casos anuales².

La leishmaniasis pertenece al grupo de las enfermedades desatendidas del mundo que afecta principalmente a comunidades que habitan en los países en subdesarrollo y a las poblaciones más pobres y vulnerables del planeta²². En las comunidades con bajo nivel socioeconómico, la prevalencia y persistencia de la leishmaniasis es mayor debido a varios factores sociales como las malas condiciones de vivienda, desnutrición especialmente en niños, bajo acceso al sistema de salud en habitantes de zonas remotas, obstáculos para acceder a los servicios de salud, altos costos del tratamiento, incremento de la población del mosquito vector cohabitante con los reservorios, bajos niveles de educación y por lo tanto poco conocimiento de ésta. Por lo anterior, la leishmaniasis representa un serio problema de salud pública en el mundo²².

Colombia no es ajena a esta problemática, presentándose 10146 casos nuevos de leishmaniasis en el año 2012⁵.

1.1.2. Agente etiológico

El parásito causante de la leishmaniasis fue reportado por primera vez a finales de 1800's y comienzos de 1900's, aunque existen reportes de lesiones compatibles con leishmaniasis desde 650 a.c²³. Éste parásito pertenece a la familia Tripanosomatidae y se mantiene en la naturaleza por un ciclo antropozoonótico entre su hospedero invertebrado y su hospedero vertebrado. El mosquito vector de la leishmaniasis pertenece al género *Lutzomyia* responsable de la transmisión en el nuevo mundo y del género *Phlebotomus* para el viejo mundo. La *Leishmania* tiene la capacidad de afectar a un amplio rango de vertebrados incluyendo además del humano, animales silvestres y domésticos¹.

Durante el ciclo de vida de este parásito, se presentan dos formas morfológicas, la forma amastigote y la forma promastigote. Los amastigotes viven dentro de la vacuola lisosomal de las células fagocíticas y son ingeridos por la hembra insecto cuando se alimenta de sangre. Una vez en el intestino del vector, el parásito se diferencia a promastigote que es la forma infectante para el hospedero definitivo²⁴.

El desarrollo de cualquier forma clínica está relacionado directamente con la especie de parásito infectante. En las Américas, 15 especies de parásitos del género *Leishmania* son patogénicas para el hombre, las cuales taxonómicamente han sido agrupadas en 2 subgéneros, el subgénero *Leishmania* como *L.(L)infantum*, *L. (L)mexicana*, *L. (L) venezuelensis*, y *L. (L) amazonensis*. Dentro del subgénero *Viannia* se encuentran *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) peruviana*, y *L. (V) colombiensis*, principalmente^{1;2}.

1.1.3. Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA).

La LTA se caracteriza por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas e histopatológicas ocasionadas por la especie de parásito infectante, y asociadas con la respuesta inmune del individuo afectado. Estas manifestaciones clínicas (aunque en algunos casos) se puedan tipificar en alguna forma definida, otras formas de presentación no son fácilmente clasificables.

Comúnmente las manifestaciones van desde una única lesión localizada en el lugar de la picadura del insecto (Leishmaniasis cutánea-LC), pasando por múltiples úlceras alrededor de la lesión inicial denominada Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), hasta la migración del parásito a mucosa nasofaríngea conocida como LMC²⁵.

1.1.4. Leishmaniasis cutánea (LC):

Se presenta como una lesión en el lugar de inoculación, inicialmente caracterizada por una pápula que crece lentamente hasta evolucionar a una úlcera de bordes indurados. Esta lesión puede curar espontáneamente en el transcurso de meses o incluso años. En el nuevo mundo, la LC es causada principalmente por *L.(V) braziliensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) guyanensis*, *L.(V) peruviana* y *L.(L)mexicana*¹.

1.1.5. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

En el nuevo mundo la LMC es una consecuencia de la migración del parásito a tejido mucoso de la boca y sistema respiratorio superior, por diseminación linfática o

hematógena después de la infección primaria¹. Estas lesiones mucosas pueden aparecer concomitantemente con la lesión cutánea o incluso meses y años después de cura de la lesión cutánea^{1; 7; 8}. Las lesiones nasales se presentan con nódulos e infiltraciones del tabique principalmente, pero a medida que progresa la enfermedad, se puede ver comprometida la mucosa oral con compromiso de paladar, faringe y laringe. En etapas avanzadas, hay destrucción total del tabique nasal y mutilaciones. Esta forma no cura espontáneamente y puede asociarse a sobreinfección con otros microorganismos. *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*, son las principales causantes de la LMC, aunque otras especies pueden estar involucradas^{1; 6}. No obstante, menos del 5% de los pacientes con la forma cutánea de LTA desarrollarán la forma mucosa metastásica²⁶.

1.1.6. Otras formas de presentación de LTA:

Como leishmaniasis cutánea difusa, anérgica, *borderline* y cutánea atípica, son algunas de las denominaciones que se le han dado a presentaciones menos comunes de la enfermedad, basadas no solamente en la presentación clínica sino en el contexto inmunológico en el que se presentan.

1.2. Respuesta inmune primaria ante la infección por *Leishmania*.

Al momento de la picadura del insecto portador en el humano, el parásito ingresa a la epidermis en forma de promastigote metacíclico, forma flagelar y motil de *Leishmania*. Dichos promastigotes son internalizados por células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. La proteína C3b del complemento se une a la superficie del parásito favoreciendo la opsonización por los receptores de C3b presentes en los fagocitos. Una vez dentro del macrófago (célula blanco de la infección por *Leishmania*), el parásito se diferencia a su forma intracelular inmóvil denominada amastigote. Cuando se fusiona el lisosoma con el fagosoma que contiene el parásito, *Leishmania* resiste a la destrucción por el estallido oxidativo del macrófago y se multiplica hasta romper la célula quedando libre para invadir nuevos macrófagos⁵⁸.

1.3. Respuesta inmune humoral

En los humanos infectados por *Leishmania* aparecen anticuerpos anti-*Leishmania* en el suero. En LC generalmente están presentes niveles más bajos durante la fase activa de la enfermedad, comparados con pacientes con LMC¹¹. Estos títulos de anticuerpos decrecen cuando el paciente alcanza la cura clínica de las lesiones, ya sea por la administración de tratamiento o por cura espontánea hasta niveles indetectables^{12; 16; 27}.

En el curso natural de la infección se genera una activación policlonal de células B, por lo tanto, los pacientes infectados con especies de *Leishmania* producen gran cantidad de anticuerpos en reacción a la infección, sin embargo la mayoría de estos anticuerpos no son específicos²⁸. En los pacientes con enfermedad activa se presenta un aumento en niveles de IgG, principalmente, y en menor proporción IgM e IgA^{28; 29}.

La IgG no es útil en la protección contra el parásito intracelular y no se le ha atribuido un papel neutralizante, por el contrario los anticuerpos contribuyen a la progresión de la enfermedad debido a su evidente participación en el proceso de opsonización, facilitando la internalización del protozoo al macrófago. Esta opsonización está mediada por el receptor para la fracción Fc de los anticuerpos, presente en las células fagocíticas²⁹. El ingreso a la célula fagocítica parece promover la sobrevivencia del patógeno^{29; 30}.

Por otro lado, se ha reportado que estos anticuerpos producidos no están dirigidos solamente contra las moléculas de superficie de la *Leishmania*, sino contra proteínas endógenas también. Se ha postulado que durante la infección, una porción de promastigotes/amastigotes son destruidos, liberando así grandes cantidades de componentes intracelulares, los cuales pueden ser reconocidos por las CPA³¹.

En las etapas iniciales de la infección, se elevan significativamente los niveles de IgG³². Las subclases de IgG presentes en los pacientes pueden variar con cada una de las formas clínicas de la leishmaniasis. Así, en la LC se elevan principalmente las subclases IgG1 e IgG3^{33; 34; 35}, en la LV predomina IgG1³³ y en la LMC el aumento principalmente se debe a la IgG3^{34; 35}.

1.4. Diagnóstico de LMC:

Debido a que las formas de leishmaniasis descritas no curan espontáneamente (excepto algunos casos de LC) el diagnóstico adecuado y a tiempo es necesario para que se administre el tratamiento apropiado y de esta manera, evitar secuelas irreversibles en los pacientes e incluso la muerte por complicaciones de las mismas.

1.4.1. Métodos parasitológicos

El diagnóstico de la leishmaniasis se basa principalmente en criterios clínicos y epidemiológicos¹³.

La observación directa del parásito es el criterio principal para confirmar la sospecha clínica de la leishmaniasis. El examen directo es un método rápido, económico y sencillo de desarrollar. Se realiza por medio de la toma de muestra directamente de la lesión en láminas portaobjeto y es coloreado con derivados que basan su uso en el principio de Romanowsky. La biopsia de piel es de utilidad diagnóstica cuando han resultado negativos tres exámenes directos de la lesión^{8,13}. La sensibilidad de estos métodos de observación directa, varía de acuerdo a la forma clínica, al tiempo de progresión de la enfermedad, además del estado inmunológico del paciente, también de la toma de la muestra y el procesamiento posterior por parte del personal de salud. Para la LMC, la sensibilidad de estas técnicas puede llegar a ser hasta de un 15%^{8,10}, ya que las lesiones cursan con gran infiltrado leucocitario y bajo número de parásitos en las lesiones³⁶.

1.4.2. Métodos serológicos:

Los métodos serológicos son una alternativa en el diagnóstico de la LMC los cuales se fundamentan en la detección de anticuerpos circulantes dirigidos contra el parásito. Los anticuerpos producidos en el momento de la infección caen hasta niveles indetectables después de la cura de la enfermedad por lo tanto su detección es una herramienta valiosa en el diagnóstico de leishmaniasis activa.

Los métodos más usados para la detección de los anticuerpos anti-*Leishmania* son las pruebas de IFI y de ELISA.

1.4.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Es una técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico de la leishmaniasis en la

cual se determina la presencia de anticuerpos dirigidos contra los epítopes estructurales de superficie del parásito, empleando parásitos completos de *Leishmania spp.* Esta es una técnica que presenta sensibilidad dependiendo de la especie infectante (70%-80%), además su especificidad se ve afectada por las reacciones cruzadas que se presentan con otros agentes infecciosos u otras entidades clínicas^{11,12,14,15,16} dificultando así la determinación de verdaderos positivos para LMC.

La IFI es la técnica estándar para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis en Colombia; el Ministerio de la Protección Social en Colombia determina para el diagnóstico de la LMC los títulos $\geq 1:16$ y para LV $\geq 1:32$ ¹³.

1.4.2.2. Ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzimas (ELISA):

Esta técnica permite la identificación de anticuerpos dirigidos contra epítopes del parásito. Generalmente se usan antígenos crudos de *Leishmania spp.* El ELISA ha mostrado ser más sensible (~80-95%) que el IFI⁵¹, pero su especificidad (60-80%) está determinada por el antígeno utilizado^{11,12}.

1.4.3. Fracciones antigénicas:

Los anticuerpos son específicos de epítopo, cuyo determinante antigénico está conformado por entre 5-10 aminoácidos, tanto lineales como conformacionales. Por lo tanto, cuando un parásito completo o un lisado de cientos de proteínas son usados para capturar anticuerpos, pueden detectarse igualmente cientos de anticuerpos específicos para cada proteína o parte de ella. Así que cuando el parásito comparte características estructurales o funcionales con otros, se pueden presentar reacciones cruzadas en el diagnóstico.

Con la finalidad de disminuir estos falsos positivos e incrementar la sensibilidad y especificidad en la detección, se han direccionado las investigaciones a la identificación de proteínas específicas del género *Leishmania* o fracciones de las mismas hacia las cuales se desarrollen anticuerpos en el curso natural de la infección por especies de *Leishmania*.

1.4.4. Proteínas altamente conservadas: Los eucariotas presentan moléculas evolutivamente conservadas. En *Leishmania*, se han identificado estas proteínas por cribado en bibliotecas de expresión con sueros de animales y humanos infectados³¹. Dentro de estas proteínas en *Leishmania*, las más estudiadas han sido las proteínas de choque térmico (HSPs), las proteínas nucleosomales y las proteínas ribosomales las cuales comparten la característica de ser liberadas en complejos multiprotéicos lo que favorece su detección y captura por las CPA por su mayor tamaño y por lo tanto la inducción de una respuesta inmune contra ellas. Estas proteínas han sido reportadas como antígenos durante el transcurso de otras enfermedades infecciosas^{53,54,55}, incluso en enfermedades autoinmunes⁵⁶ y por esta razón han sido llamadas Panantígenos. Teniendo en cuenta entonces el conocimiento generado en torno a estas proteínas y su potencial utilidad con fines diagnóstico, se han considerado estas moléculas en el desarrollo de nuevas herramientas tendientes a la identificación temprana de la enfermedad^{31,37}

1.4.4.1. Proteínas ribosomales: El ribosoma en *Leishmania* está constituido por dos subunidades, una grande denominada 60S y una pequeña, la 40S. Cada una de estas subunidades presenta a su vez ARNr y proteínas asociadas.

1.4.4.1.1. Subunidad 60S: La subunidad grande está compuesta por alrededor de 49 proteínas diferentes y 3 moléculas de ARN (25S, 5.8S y 5S). La inmunogenicidad de estas proteínas en la infección por especies de *Leishmania* ha sido ampliamente estudiada. Las proteínas acídicas ribosomales P0, P1 y P2 han sido documentadas en las especies de *Leishmania* y se han hecho estudios encaminados a generar tanto vacunas como métodos diagnósticos basados en ellas¹⁸.

1.4.4.1.2. Subunidad 40S: La subunidad pequeña contiene cerca de 33 proteínas diferentes y una molécula de ARN (18S). Las proteínas pertenecientes a esta subunidad se denominan generalmente con el prefijo S (Small).

1.4.4.1.2.1. Proteína S5: La proteína S5 se ha identificado en especies de *Leishmania*. La estructura lineal de la proteína S5 de *L. braziliensis* está conformada por 190 aminoácidos.

1.4.4.1.2.2. Proteína S25: al igual que la proteína S5, esta proteína se ha identificado en especies de *Leishmania*. Está compuesta por 120 aminoácidos.

Estas 2 proteínas presentan una identidad mayor al 95% con las demás especies causantes de Leishmaniasis en el nuevo mundo.

1.4.5. Fracciones protéicas como antígeno para el serodiagnóstico:

Estudios realizados en proteínas ribosomales derivadas de *Leishmania* revelan que cuando se usa la proteína completa como antígeno para el diagnóstico por ELISA se presentan reacciones cruzadas con suero de pacientes con otras enfermedades, sin embargo cuando se remueve una fracción de esta proteína (fracción más

conservada) se elimina dicha reacción cruzada resultando en una detección de anticuerpos más específica¹⁸. Por lo anterior es de utilidad determinar los sitios de unión de los anticuerpos a una proteína (epitope), proceso denominado Mapeo epitópico para lo cual se sintetizan pequeños fragmentos (péptidos) abarcando la totalidad de la proteína para su valoración individual. Teniendo en cuenta esto, varios estudios en proteínas conservadas de *Leishmania spp.* han identificado uno o varios sitios de unión a éstas, empleando el ELISA para la captura de dichos anticuerpos, siendo este reconocimiento específico de *Leishmania*^{59,60}.

2. Objetivos

2.1. General:

Analizar la potencial utilidad diagnóstica de péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, en casos de leishmaniasis mucocutánea (LMC), mediante la detección de anticuerpos séricos por ELISA.

2.2. Específicos:

- Evaluar la reactividad de los péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, en pacientes con diagnóstico de leishmaniasis mucocutánea: sensibilidad.
- Determinar la reactividad cruzada en el reconocimiento que frente a péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, presenten sueros de pacientes con diagnóstico de otras enfermedades [parasitarias (Enfermedad de Chagas) y enfermedades autoinmunes (Lupus Eritematoso Sistémico-LES)]: especificidad.
- Establecer los posibles epítopes humorales específicos de *Leishmania spp* con utilidad diagnóstica por medio de la identificación de la(s) secuencia(s) de proteínas ribosomales de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* con mayor reactividad.
- Correlacionar la detección del perfil de subclase IgG inducido frente a los epítopes humorales identificados, con la presencia de LMC.

3. METODOLOGÍA:

3.1. Antígenos:

En este estudio fueron evaluadas 2 proteínas ribosomales de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), la proteína S25 y la proteína S5, determinando la utilidad diagnóstica de 8 y 13 péptidos sintéticos derivados de sus secuencias, respectivamente. Las secuencias a evaluar corresponden a péptidos de 15 a 19 aminoácidos (a.a) de longitud cubriendo la totalidad de la forma lineal de las proteínas en estudio.

3.1.1. Péptidos ribosomales

Los péptidos derivados de cada una de las proteínas fueron seleccionados teniendo en cuenta una longitud promedio de 15 a.a, además de la predicción de epítopes B con una herramienta bioinformática.

3.1.1.1. Proteína ribosomal S25: Esta proteína está compuesta por 120 aminoácidos (XP_001565620.1). La totalidad de la secuencia proteica desde su extremo amino hasta su extremo carboxilo, está representada en la Ilustración 1 y los péptidos sintéticos derivados de su secuencia se muestran en la Tabla 1.

Ilustración 1: Secuencia S25

MPPKAGQTKKAKMEAANKGAKTTKKWSKGQSREALQNAVDFKETYD
KLRSEVPKYKLITPSIISDRLKIAVSIAASGLKQLCREKLIRLVSCSSKTRVYT
RIVQAAPAETAAAAPASE

Tabla 1: Péptidos derivados de proteína S25

Código IMT*	Secuencia de aminoácidos**
P1	MPPKAGQTKKAKMEAA
P2	KGAKKTTKKWSKGQSREA
P3	LQNAVMFDKETYDKL
P4	RSEVPKYKLITPSI
P5	SDRLKIAVSIAADGL
P6	KQLCREKLIRLVSCS
P7	VSCSSKTRVYTRIVQ
P8	AAPAETAAAAPASE

* A partir de ahora y durante todo el texto serán referidos los péptidos con esta codificación.

3.1.1.2. Proteína ribosomal S5: Su secuencia aminoacídica está conformada por 190 aminoácidos (XP_001563009.1), representada en la Ilustración 2 desde su extremo amino hasta su extremo carboxilo. Los péptidos sintéticos derivados de su secuencia se muestran en la Tabla 2.

Ilustración 2: Secuencia de S5

MSSKTPKLFNKWSFEGQLTSELALRDHISTTAAYVPHTSGRWQKRRFHKVRMPI
 VERLANGLMFKGRGNRKLQAARLLKHTLEIIHLLTDENPLQVVVDAVSKGAPRE
 DSTRVGGGVVRRQAVDVSPMRRVNEAIYQMCKGAREAAFRNLKSMPECLADE
 IVNASKGSSNSYAIKKKDEVERVAKANR

Tabla 2: Péptidos derivados de proteína S5

Código IMT*	Secuencia de aminoácidos**
P9	MSSKTPKLFNKWSFE
P10	GLQTSELALRDHIST
P11	TAAAYVPHTSGRWQKR
P12	RFHKVRMPIVERLAN
P13	GLMFKGRGNGRKLQA
P14	ARLLKHTLEIIHLLT
P15	DENPLQVVVDAVSKG
P16	VSKGAPREDSTRVGSGGVV
P17	RRQAVDVSPMRRVNE
P18	AIYQMCKGAREAAFR
P19	NLKSMPECLADEIVN
P20	VNASKGSSNSYAIKKKD
P21	YAIKKKDEVERVAKANR

** Estos péptidos fueron sintetizados por la Dra Fanny Guzmán, en el marco de un proyecto colaborativo entre los Grupos de investigación, Núcleo de Biotecnología Curauma de la Universidad Católica de Valparaíso y el Grupo de Investigación en Inmunotoxicología de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.2. Antígeno soluble de *Leishmania* (ASL): como control de la técnica de ELISA se usó ASL los cuales convencionalmente se emplean para el diagnóstico de Leishmaniasis. Para la preparación del ASL se tomaron

promastigotes de parásitos (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* o *L. infantum*) en fase exponencial, los cuales fueron lavados 3 veces con solución salina y llevados a 10 ciclos de congelación descongelación a -80°C y 37°C respectivamente. Posteriormente fueron sonicados. Finalmente, los viales fueron centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Thermo Scientific).

3.2. Muestras de sueros:

Para este estudio se obtuvieron sueros provenientes de diversas serotecas. Las muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de Leishmaniasis fueron obtenidas del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia (n:10) y del Centro de pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, (CPqGM-FIOCRUZ) Brasil (n: 40). En total se evaluaron 25 muestras de pacientes con LMC, 20 con LC y 5 con Leishmaniasis Visceral (LV).

Adicionalmente para la validación de la técnica a desarrollar, se evaluaron 20 sueros de pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad de Chagas obtenidos del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia, y 20 sueros de pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad autoinmune (LES) provenientes del Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes CREA de la Universidad del Rosario de Colombia.

Finalmente como controles negativos se obtuvieron 20 muestras de pacientes habitantes de zona no endémica para Leishmaniasis, quienes voluntariamente accedieron a participar del estudio a través de consentimiento informado (Anexo 1).

3.3. Ensayo de Inmunoabsorción acoplado a Enzimas (ELISA):

El ELISA se llevó a cabo siguiendo 2 protocolos diferentes: Protocolo 1 estandarizado en el transcurso de este proyecto, y el protocolo 2 realizado según Souza *et al*, de ahora en adelante identificados de esta manera.

3.3.1. Protocolo 1: Se adicionaron 100ul/pozo de SLA a 5µg/ml en placas para ELISA Maxisorp (NUNC) y se llevó a incubación 2 horas a 37°C, toda la noche a 4°C y finalmente 1 hora a 37°C. Se lavó 4 veces con PBS-tween 0,5% y bloqueó con leche 5% PBS-Tween por 1 hora a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron y se adicionaron 100ul del suero de los pacientes diluidos 1:1000 en leche 3% PBS-Tween y se llevó a incubación a 37°C durante 1 hora. Se lavó la placa 4 veces y se adicionaron 100ul del anticuerpo secundario (Invitrogen) diluido 1:5000 en PBS-Tween-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. Finalmente, se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween y se reveló con la adición 100 ul del sustrato TMB (tetrametil-bencidina) por 30 minutos a temperatura ambiente y la reacción fue detenida con 50ul de HCl 1M y leída a una longitud de onda de 450nm.

3.3.2. Protocolo 2: El ensayo de ELISA fue llevado a cabo según protocolo descrito Souza *et al*. Brevemente, se adicionaron 100ul/pozo de SLA a 10µg/ml en placas para ELISA Maxisorp (NUNC) durante toda la noche a 4°C. Se lavó 4 veces con PBS-tween 0,05% y bloqueó con BSA 1% en PBS-Tween por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron y se adicionaron 100ul del suero de los pacientes diluidos 1:100 en PBS-Tween más 0,25% de BSA y se llevó a incubación a 37°C durante 1 hora. Se lavó la placa 5 veces y se adicionaron 100ul del anticuerpo secundario (SIGMA) diluido 1:2500 en PBS-Tween-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. Finalmente, se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween y se revela con la adición 100ul del sustrato pNPP (Para-nitrofenil fosfato) por 30 minutos a temperatura ambiente

y la reacción fue detenida con 50ul de NaOH 3M y leída a una longitud de onda de 405nm.

3.4. ELISA péptidos ribosomales:

Este protocolo se realizó según Souza *et al* 2013 con pequeñas variaciones. Puntualmente: a) se adicionaron los péptidos a una concentración de 50µg/ml y b) los sueros fueron incubados por 2 horas a 37°C.

3.5. Detección de Subclases de IgG:

En las muestras provenientes de pacientes con LMC y con reactividad por alguno de los péptidos analizados, se determinaron las subclases IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 utilizando anticuerpos específicos para cada uno de ellos conjugados con peroxidasa (Invitrogen). La detección se hizo por ELISA como se describe en los numerales 3.3.2 y 3.4 para ASL y péptidos ribosomales, respectivamente con pequeñas variaciones: a) Cada anticuerpo secundario específico de subclase fue adicionado a una concentración de 1:5000, b) el revelado de la placa fue hecho con Tetrametil Benzidina (TMB), c) La reacción fue detenida con HCl 1N y, d) la lectura fue hecha a una longitud de onda de 450nm.

3.6. Análisis de datos:

Se determinó para cada péptido analizado la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el diagnóstico de LMC.

Los puntos en las gráficas están representados como Índice de Reconocimiento (IR) dividiendo la absorbancia de cada punto entre el punto de corte (promedio sanos + 2 desviaciones estándar), de esta manera estableciendo positividad con índices de reconocimiento mayores a 1, y negativos inferiores al mismo⁵⁷.

La sensibilidad, especificidad, el Valor Predictivo Positivo (VPP) y negativo (VPN) de las técnicas fueron determinados con las siguientes fórmulas⁵⁷:

Sensibilidad: $VP / VP + FN$

Especificidad: $VN / VN + FP$

VPP: $VP / FP + VP$

VPN: $VN / VN + FN$

donde

VP: verdadero positivo; FN: Falso negativo; VN: verdadero negativo; FP: falso positivo.

Significancia estadística: Los resultados fueron analizados por las herramientas estadísticas no paramétricas de Mann Whitney para la comparación de 2 grupos y Kruskal Wallis para la comparación de 3 grupos o más.

4. ELISA convencional

En este estudio se evaluó la utilidad de péptidos ribosomales derivados de *L. braziliensis* como candidatos a antígenos para la inmunodetección de anticuerpos con fines diagnósticos en pacientes con LMC.

Para este fin, inicialmente se realizó la evaluación de los sueros de pacientes con leishmaniasis, usando el ASL como antígeno, método empleado convencionalmente para dicho diagnóstico.

4.1. ELISA convencional de sueros de pacientes con leishmaniasis:

Para el proceso de estandarización del ELISA se determinaron las condiciones óptimas a usar en cada uno de los puntos críticos del proceso. Para esto, se empleó un suero positivo de un paciente con diagnóstico confirmado para LMC (títulos >1:256 por IFI) usado como control positivo en el proceso de estandarización.

Se determinó inicialmente la concentración de antígeno a adsorber a las placas comparando las absorbancias obtenidas con la muestra control positivo *versus* sueros de voluntarios sanos, y de esta manera se estableció el punto en donde se encontraron mayores diferencias entre los grupos muestrales, valorando concentraciones desde 0,1 µg/ml hasta 10 µg/ml de ASL, encontrando que con 5µg/ml la absorbancia del control positivo es 0.5 veces mayor que el control sano, bajo las condiciones usadas en ese punto.

Posteriormente, se evaluaron soluciones de bloqueo de sitios inespecíficos, utilizando diversas concentraciones de leche descremada, BSA, y una combinación de las mismas. Se seleccionó leche descremada al 5%, la cual mostró las absorbancias más bajas en pozos sin antígeno.

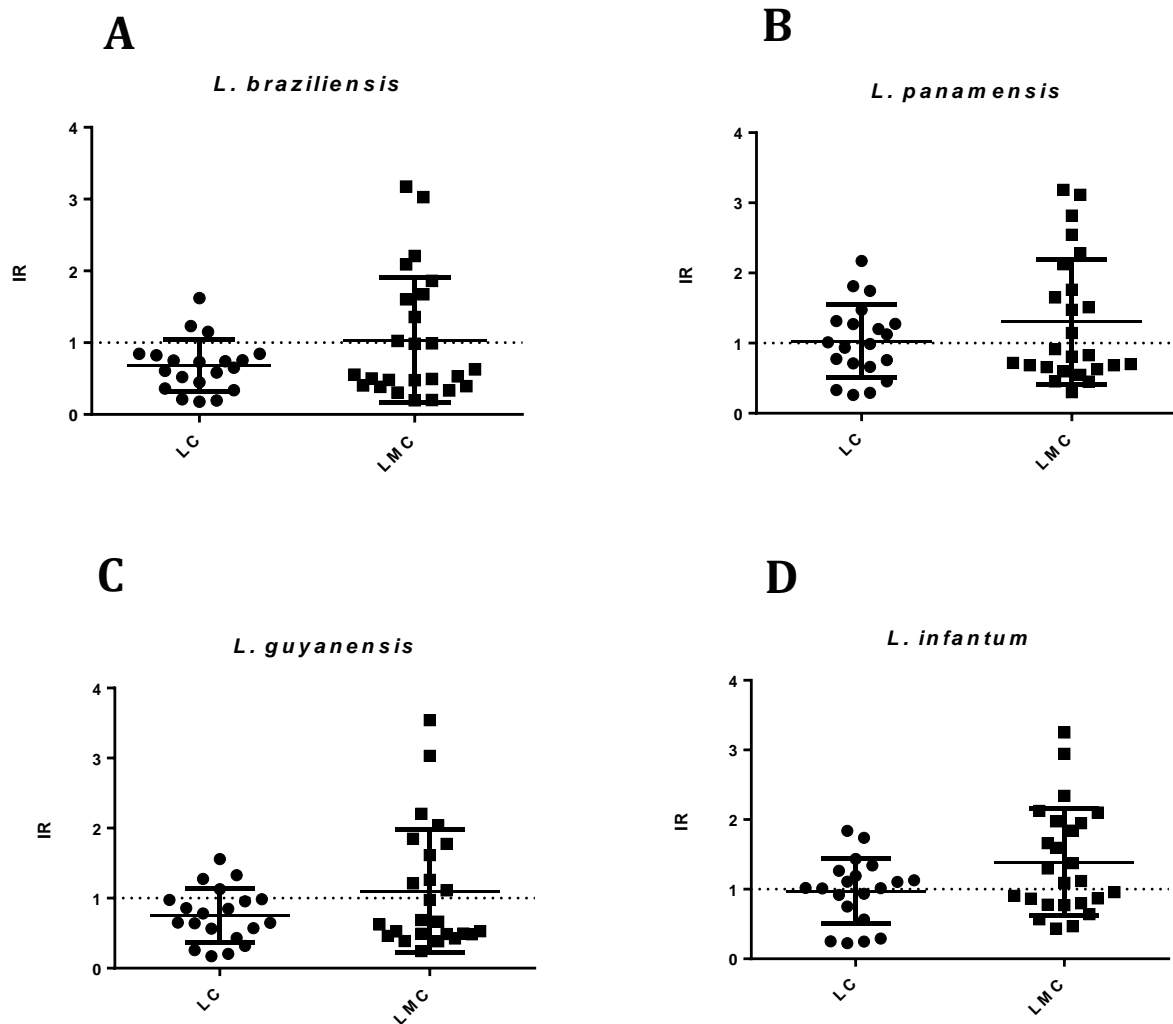
Finalmente, se estableció la dilución del anticuerpo primario evidenciando mayores diferencias entre control positivo y voluntarios sanos en la dilución 1:1000, además que la dilución del anticuerpo secundario (Anticuerpo anti-IgG acoplado a Peroxidasa de rábano HRP) óptima fue 1:5000.

A partir de las condiciones anteriores, se elaboró el protocolo y se inició la valoración de los sueros en estudio. En la gráfica 1 se representa la absorbancia de los sueros de individuos con LMC, representados de ahora en adelante como LMC, e individuos con Leishmaniasis Cutánea (LC). La línea punteada señala el IR en 1, valor considerado como punto de corte.

Cada punto en la gráfica representa el promedio de un individuo evaluado cuyas muestras fueron corridas por duplicado con tres réplicas de cada uno (Gráficas muestran un experimento representativo). Estos resultados indican que la sensibilidad de esta técnica en la detección de anticuerpos anti-leishmania es del 36% para LMC y del 15% para LC usando ASL de *L. braziliensis* sin observarse diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0,4851$). Además, cuando se evalúa el ASL de otras especies de *Leishmania*, la sensibilidad varía como lo muestra la Gráfica 1 sin diferencias significativas entre LMC y LC con ninguna de dichas especies evaluadas.

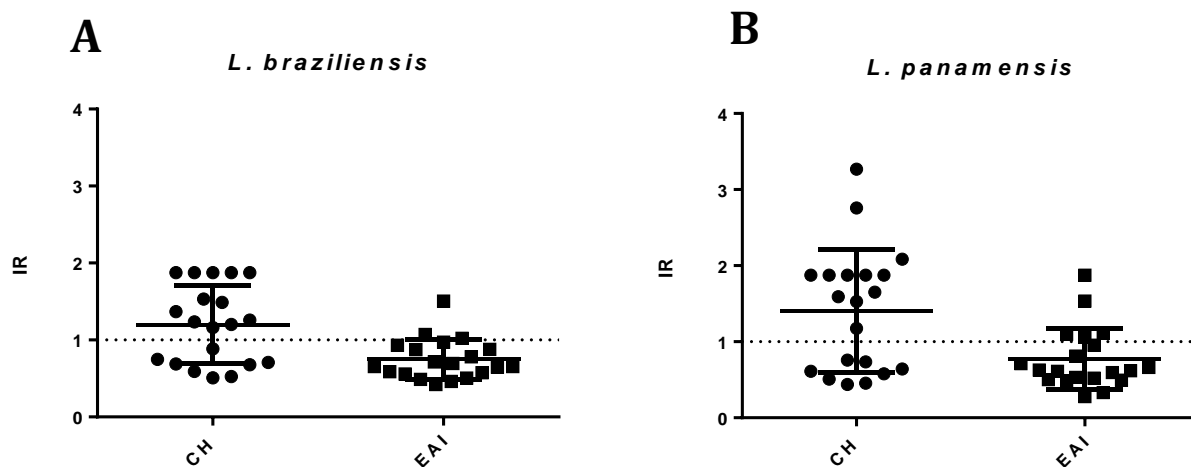
Con el objetivo de determinar la especificidad en la detección de anticuerpos anti-Leishmania, se determinó la reacción cruzada frente a sueros de individuos con Enfermedad de Chagas (CH) y enfermedades autoinmunes (EAI). La gráfica 2 muestra las densidades ópticas de cada una de estas muestras, evidenciando una reactividad de los sueros CH del 60% y de los sueros EAI del 10% cuando se usa ASL de *L. braziliensis*. Estos resultados son resumidos en la Tabla 3.

Gráfica 1



Evaluación de protocolo 1 usando como antígeno ASL de (A): *L. braziliensis* diferencias entre LMC y LC $p= 0.4851$; (B) *L. panamensis* diferencias entre LMC y LC $p=0,2123$; (C) *L. guyanensis* diferencias entre LMC y LC $p= 0,4994$ y (D) *L. infantum* diferencias entre LMC y LC $p=0,1405$.

Gráfica 2



Evaluación con protocolo 1 de la reacción cruzada con individuos con enfermedad de Chagas (CH) y Enfermedades autoinmunes (EAI) usando A) *L. braziliensis* como antígeno ($p=0,0032$) y B) *L. panamensis* como antígeno ($p= 0,0113$).

Tabla 3

	Sensibilidad		Especificidad	VPP	VPN
	LMC	LC		LMC	
<i>L. braziliensis</i>	36% (9/25)	15% (3/20)	62,5% (25/40)	44,4%	52,08%
<i>L. panamensis</i>	44% (11/25)	50% (10/20)	57,5% (23/40)	55,26%	54,7%
<i>L. guyanensis</i>	40% (10/25)	20% (4/20)	ND	ND	ND
<i>L. infantum</i>	56% (14/25)	60% (12/20)	ND	ND	ND

Características del ELISA con ASL de *Leishmania spp.* protocolo 1. ND: no determinado.

De los resultados del ELISA empleando como antígeno ASL de las especies de *Leishmania* descritas, podemos determinar que la sensibilidad de dicha prueba en

Resultados

la detección de anticuerpos anti-leishmania como diagnóstico, es baja. Utilizando *L. braziliensis*, la sensibilidad para detectar pacientes con LMC es más alta (36%) que para LC (15%); mientras que usando *L. panamensis* las sensibilidades son ligeramente mayores -siendo más sensible para LC (50%) que para LMC (44%). Igualmente la especificidad de esta técnica es menor al 70% por lo tanto sus VPP y VPN no superan el 60%.

Teniendo en cuenta estos resultados, y aun considerando cada una de las variables y modificaciones posibles, se evidencia la baja sensibilidad de este protocolo estandarizado, en el diagnóstico serológico de la leishmaniasis y por lo tanto su insuficiente validez para ser tomado como técnica diagnóstica convencional con fines comparativos. Como medida alterna, se dispuso a evaluar un segundo protocolo (*Souza et al*) empleado en el CPqGM-FIOCRUZ (ver metodología 3.3.2) Los resultados de esta técnica se representan en la gráfica 3.

Tabla 4

	Sensibilidad		Especificidad	VPP	VPN
	LMC	LC		LMC	
<i>L. braziliensis</i>	84% (21/25)	75% (15/20)	52,5%	55,8%	69,4%
<i>L. panamensis</i>	85% (17/20)	80% (16/20)	ND	ND	ND
<i>L. guyanensis</i>	75% (15/20)	80% (16/20)	ND	ND	ND
<i>L. infantum</i>	75% (15/20)	80% (16/20)	ND	ND	ND

Características del ELISA con ASL de *Leishmania spp.* protocolo 2. ND: No determinado

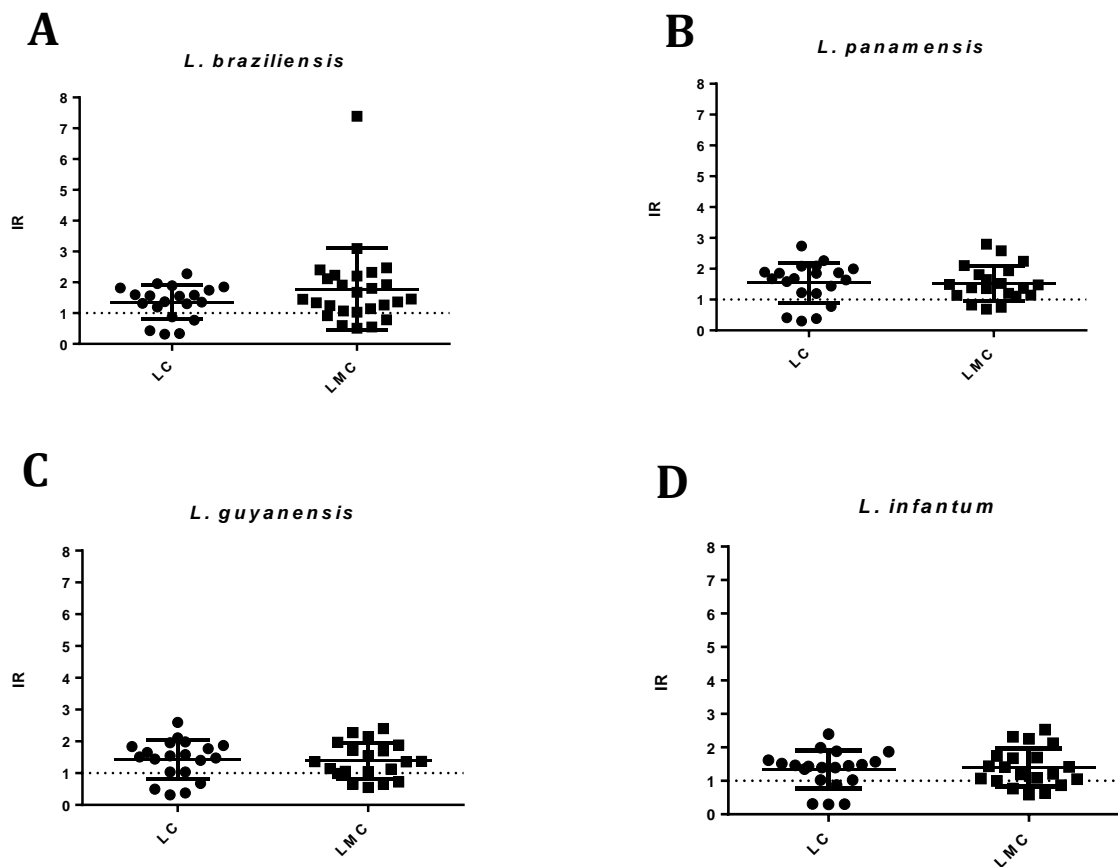
Los datos señalan que, evidentemente al emplear este protocolo 2, aumenta la sensibilidad en la detección de anticuerpos anti-leishmania para todos los ASL

evaluados. Por ejemplo, empleando *L. braziliensis*, la sensibilidad para la detección de LMC aumenta del 36% al 84% y para LC del 15% al 75% haciendo por lo tanto de este protocolo 2 el adecuado para ser usado como método de referencia para este estudio.

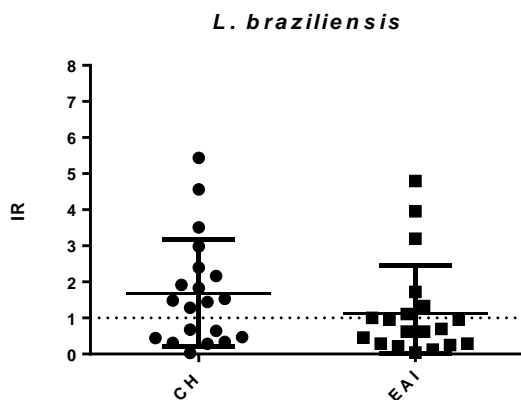
Cuando se emplea el ASL de *L. panamensis* y *L. braziliensis* como antígeno, se pueden diagnosticar como positivas un número mayor de muestras que usando *L. guyanensis* o *L. infantum*, en el caso de LMC. Por el contrario, para las muestras procedentes de pacientes con LC asociadas con *L. braziliensis* se detectaron anticuerpos en menor cantidad de muestras, respecto a las demás especies (Ver Tabla 4).

A pesar que esta metodología permite diagnosticar individuos con Leishmaniasis, la especificidad de dicha prueba no fue mejor, presentando además reactividades cruzadas con sueros de individuos con Enfermedad de Chagas y en menor proporción con EAI (Gráfica 4)

En todos los casos no hubo diferencias significativas entre el grupo LC y el grupo LMC, indicando que los títulos de anticuerpos anti-leishmania son similares en ambas presentaciones clínicas de la enfermedad.

Gráfica 3: ELISA de sueros de pacientes con Leishmaniasis empleando ASL.

Evaluación de protocolo 2 usando como antígeno ASL de (A): *L. braziliensis* diferencias entre LMC y LC $p=0.3352$; (B) *L. panamensis* diferencias entre LMC y LC $p=0,5246$; (C) *L. guyanensis* diferencias entre LMC y LC $p=0,7119$ y (D) *L. infantum* diferencias entre LMC y LC $p=0,9816$.

Gráfica 4.

Evaluación con protocolo 2 de la reacción cruzada con individuos con enfermedad de Chagas (CH) y Enfermedades autoinmunes (EAI) usando *L. braziliensis* como: antígeno ($p=0,1065$).

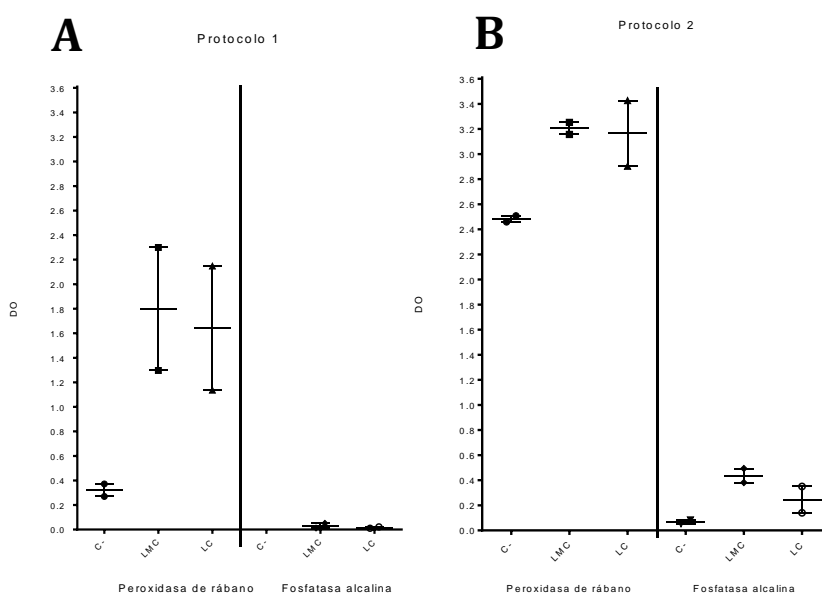
Debido a la diferencia de los resultados derivada del uso de dos protocolos similares, se listan en la tabla 5 las principales diferencias entre ambos protocolos.

Tabla 5: Diferencias entre protocolo 1 y 2

Variable	Protocolo 1	Protocolo 2
Solución de bloqueo	Leche descremada 5%	BSA 1%
Dilución de suero	1:1000	1:100
Enzima de anticuerpo secundario	Peroxidasa de rábano	Fosfatasa alcalina
Dilución de Anticuerpo secundario	1:5000	1:2500

Antes de la normalización de los datos con los índices de Reactividad IR, fue evidente que las absorbancias obtenidas con el protocolo 1 fueron ampliamente mayores que aquellas obtenidas con el protocolo 2 (datos no mostrados). Se determinó entonces si, la diferencia en absorbancias se debía al anticuerpo secundario usado para lo cual se realizó la evaluación de algunas muestras (Control negativo [C-], LC y LMC) con el protocolo 1 empleando el anticuerpo secundario del protocolo 2 y viceversa (Gráfica 5).

Gráfica 5



Evaluación de los 2 anticuerpos secundarios macados con peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina con A) protocolo 1 y B) protocolo 2.

Resultados

Las densidades ópticas (DO) señalan que independientemente del protocolo empleado, las absorbancias son más altas cuando se emplea el anticuerpo acoplado a la peroxidasa igualmente que las dispersiones entre los duplicados son más amplias.

4.2. Discusión

La técnica de ELISA indirecta es usada ampliamente en la detección de anticuerpos dirigidos contra agentes infecciosos, con fines diagnósticos. En leishmaniasis esta técnica resulta más sensible para el diagnóstico comparado con el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), debido a que detecta anticuerpos dirigidos tanto contra la superficie del parásito, como frente a proteínas intracelulares cuando se usan lisados de parásitos (ASL) como antígeno.

En nuestro estudio establecimos que bajo las condiciones empleadas, la sensibilidad y especificidad de dicha técnica son similares a lo reportado por diversos autores^{11; 12; 37; 38; 39}. Cuando se comparan las diferencias entre el ASL de una especie con otra, se encuentra que *L. braziliensis* y *L. panamensis* detectan más muestras LMC como positivas que *L. guyanensis* y *L. infantum*, probablemente debido a que estas primeras son las principales especies con tropismo por mucosa, lo que indicaría que cuando se usa la especie infectante como antígeno, la sensibilidad del ELISA es mayor.

En el momento de la estandarización del protocolo 1 dichas condiciones permitían la diferencia entre control positivo y control negativo, sin embargo cuando se empleó un número de muestras mayor, se evidenció que la sensibilidad de la técnica no era muy alta por la imposibilidad del ELISA de identificar sueros con niveles bajos de anticuerpos y por lo tanto la baja resolución en el reconocimiento de anticuerpos anti-leishmania en individuos con diagnóstico confirmado de leishmaniasis. Es interesante observar que cuando se evalúan sueros de individuos CH con este protocolo 1 -y a pesar de su baja sensibilidad- detecta el 60% como positivos evidenciando la alta reacción cruzada entre personas afectadas por estos dos parásitos (como ha sido reportado previamente)^{15; 37}.

En un intento por descartar que la no detección de anticuerpos se debiera a su degradación, se procedió a evaluar el segundo protocolo, previamente reportado por Souza et al y usado en CPqGM-FIOCRUZ (lugar de donde provinieron la mayoría de muestras de suero usadas en este estudio). Con este segundo protocolo, la detección de muestras positivas usando ASL de *Leishmania spp.*

aumentó hasta valores similares a sensibilidades reportadas por diversos autores, haciendo a éste apropiado para dichas evaluaciones.

Aunque es poco probable que se identifique la especie infectante en cada individuo, el diagnóstico serológico se realiza en la especie más prevalente de la región para cada forma clínica, es decir, en Colombia para el inmunodiagnóstico de LC se emplea *L. panamensis* como antígeno y para LMC se utiliza *L. braziliensis*⁴.

En nuestro estudio encontramos que existen pequeñas diferencias de sensibilidades dependiendo de la forma clínica y de la especie usada como antígeno, así la prueba es más sensible cuando se usa *L. panamensis* o *L. braziliensis* como antígeno que cuando se usa *L. guyanensis* o *L. infantum* para diagnosticar LMC. Además solamente *L. infantum* tuvo la capacidad de detectar como positivas el 100% de los sueros LV, correlacionándose con el tropismo de cada una de las especies evaluadas.

A pesar que reportes señalan que en pacientes con LMC los niveles de anticuerpos son mayores a LC, en este estudio no hubo diferencias entre estas dos presentaciones clínicas. Cuando se analizó la reacción cruzada con este protocolo 2, a pesar de ser más sensible para Leishmaniasis, se obtiene el mismo número positivo de muestras CH con reactividad frente a *L. braziliensis* que con el protocolo 1 generando por lo tanto baja especificidad en la detección de anticuerpos anti-leishmania. Es evidente que la cercanía taxonómica de estos dos parásitos, comprueba que pueden estar compartiendo antígenos que inducen la producción de anticuerpos detectables por este tipo de técnica. Además estas dos enfermedades se presentan simultáneamente en diversas regiones geográficas haciendo necesario un diagnóstico más específico. Algunos sueros EAI reaccionaron frente a *L. braziliensis*, sin embargo, bajo condiciones normales un individuo no genera auto-anticuerpos, por tanto es menos probable que éstas enfermedades puedan estar generando falsos positivos en el diagnóstico de Leishmaniasis.

Finalmente, cuando se comparan ambos protocolos con el propósito de identificar la variable que genera las diferencias en sensibilidades, evidenciamos que simplemente con variar el anticuerpo secundario (Anti-IgG humana) marcado con una u otra enzima, las diferencias en densidades ópticas son amplias, siendo más altas aquellas obtenidas cuando se emplearon anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano. Por otra parte la variabilidad entre un punto y su duplicado también es más amplia. Por lo anterior, es posible que las altas densidades ópticas

Resultados

enmascaren algunos resultados positivos con bajos niveles de anticuerpos y por lo tanto sea menos sensible.

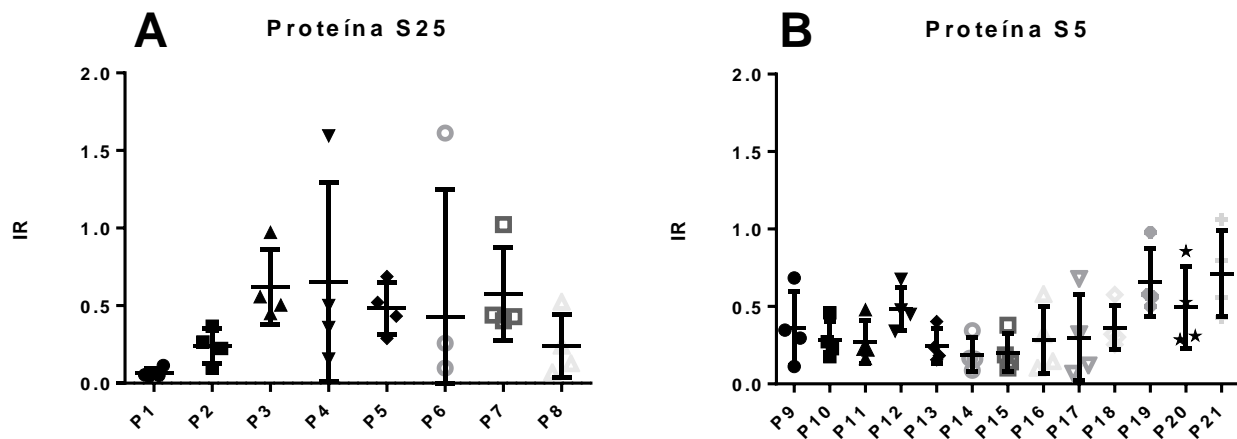
.

5. Péptidos ribosomales

5.1. ELISA basado en péptidos

Establecidas las condiciones que permitieron diferenciar rangos positivos y negativos, se procedió a estandarizar el método de detección de anticuerpos usando cada uno de los péptidos ribosomales como antígeno adsorbido en las placas, para lo cual se tomó una muestra positiva y una negativa como controles. Se determinó entonces que, la concentración a adherir a las placas era de 50µg/ml de cada péptido y que el tiempo de incubación óptimo de los sueros era de 2 horas a 37°C. Las demás condiciones del ELISA se realizaron igual al método convencional.

Gráfica 6



Evaluación de sueros de pacientes con LMC con todos los péptidos derivados de A) proteína S25 y B) proteína S5

La gráfica 6 muestra la reactividad de cada uno de los péptidos derivados de las proteínas S25 y S5, valorados inicialmente con 4 sueros de individuos con LMC, los cuales fueron positivos con el método convencional, lo anterior con el fin de realizar un tamizaje de estos péptidos como antígenos en el ELISA.

De todos los péptidos evaluados se pudo observar que la mayoría de los IR no superaron el 1, debido a que si bien se presentan densidades ópticas altas en

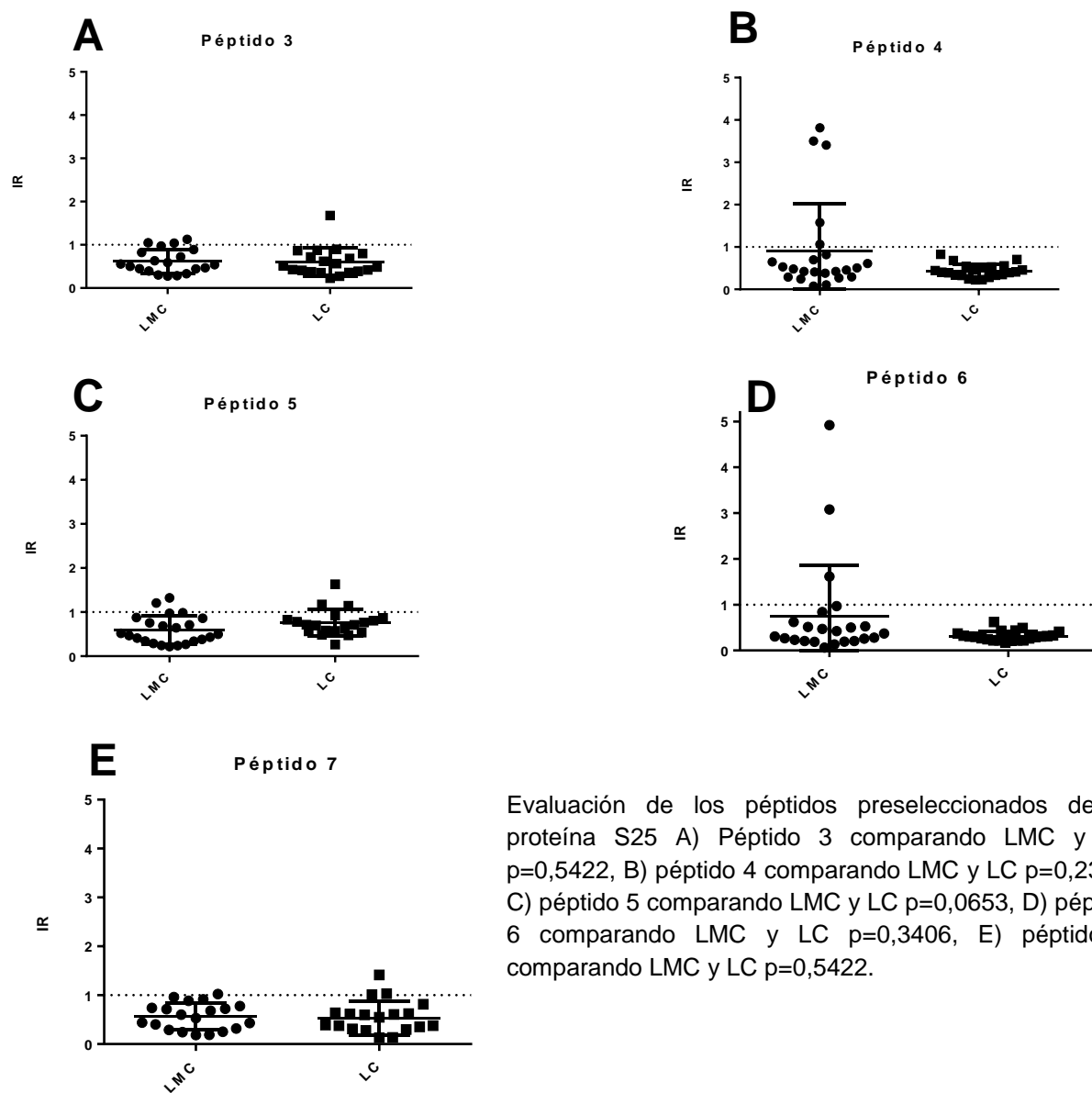
Resultados

algunos de éstos, la absorbancia de los sueros procedentes de los controles sanos también aumentó, haciendo las diferencias entre éstos igualmente pequeñas.

De los péptidos de la proteína S25 destacamos que los P3, P4, P5, P6 y P7 presentaron los mayores IR y de la proteína S5 el P12, P19 y P21. Estos péptidos, se preseleccionaron para ser valorados con un número de muestras más amplio.

Los péptidos preseleccionados de la proteína S25 se muestran en la Gráfica 7.

Gráfica 7



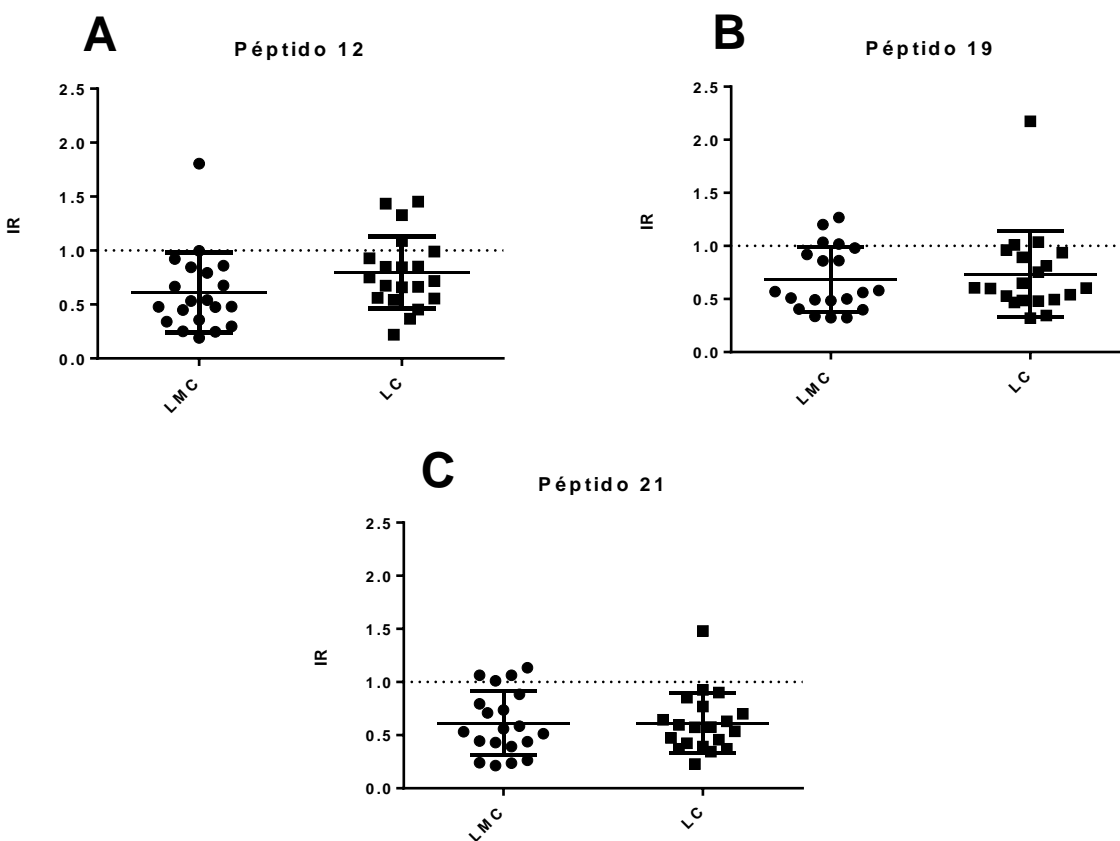
Evaluación de los péptidos preseleccionados de la proteína S25 A) Péptido 3 comparando LMC y LC $p=0,5422$, B) péptido 4 comparando LMC y LC $p=0,2334$, C) péptido 5 comparando LMC y LC $p=0,0653$, D) péptido 6 comparando LMC y LC $p=0,3406$, E) péptido 7 comparando LMC y LC $p=0,5422$.

Péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania spp* en leishmaniasis mucocutánea: utilidad diagnóstica.

Se evidenció que al utilizar cada uno de estos 5 péptidos, la detección de anticuerpos anti-leishmania, es baja debido a que ninguno se detectó como positivo en más del 30% de las muestras empleadas. Sin embargo, los péptidos 4 y 6 fueron reconocidos por la mayor cantidad de muestras, además de presentar densidades ópticas más altas comparadas con los demás péptidos.

La reactividad de los péptidos preseleccionados de la proteína S5 frente a las muestras, es representada en la gráfica 8. Al igual que en la proteína S25, estos 3 de S5 no detectaron por más del 30% de las muestras evaluadas. Para esta proteína, el P12 permitió la identificación del mayor número de individuos.

Gráfica 8



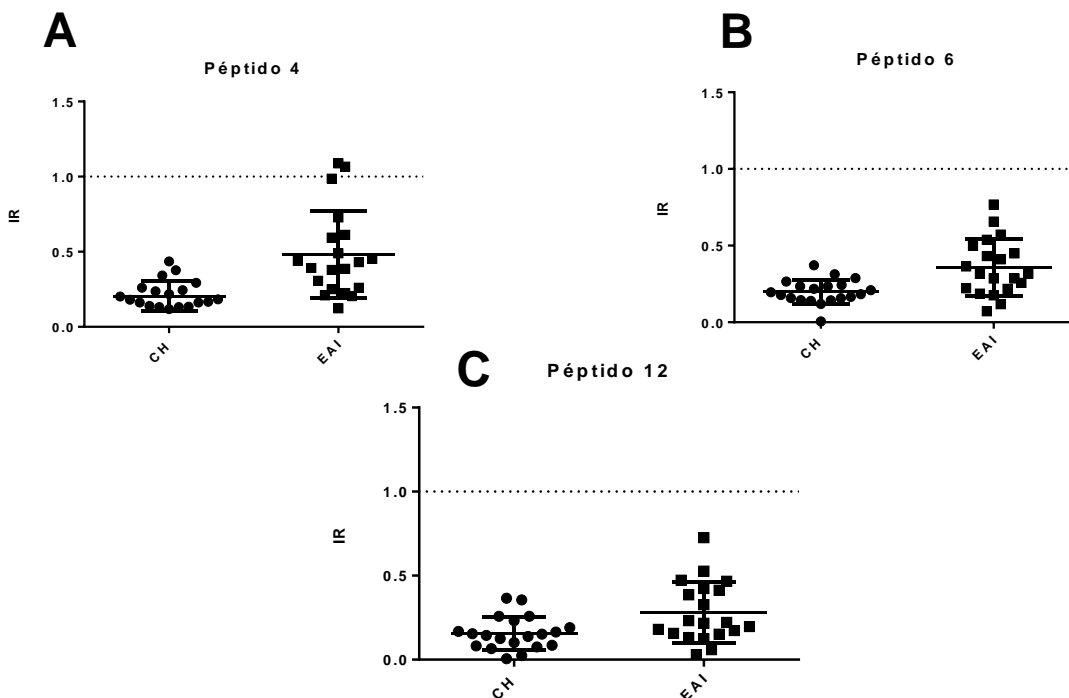
Evaluación de los péptidos preseleccionados de la proteína S5 A) Péptido 12 comparando LMC y LC $p=0,0427$, B) péptido 19 comparando LMC y LC $p=0,7119$, C) péptido 21 comparando LMC y LC $p=0,9816$.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se procedió con la evaluación de la reacción cruzada de los P4, P6 y P12 frente a sueros de individuos con diagnóstico

Resultados

confirmado de Enfermedad de Chagas y enfermedades Autoinmunes (ver gráfica 9).

Gráfica 9



Evaluación de la reacción cruzada de los péptidos de la proteína S25 A) Péptido 4 comparando CH y EIA $p < 0,0001$, B) péptido 6 comparando CH y EIA $p = 0,0018$ y C) péptido 12 comparando CH y EIA $p = 0,0164$.

Excepto un par de muestras, cuando se usa el P4 como antígeno, tanto los sueros CH como los sueros EAI fueron negativos frente a los 3 péptidos (P4, P6 y P12), indicando que la reacción cruzada que se puede presentar con estos individuos con otras afecciones diferentes a Leishmaniasis es baja, cuando estos péptidos son empleados para detectar anticuerpos. La Tabla 6 resume los resultados obtenidos frente a estos péptidos derivados de ambas proteínas.

Se evidencia entonces que la sensibilidad de estos péptidos es menor que cuando se usa el ELISA convencional empleando ASL como antígeno, sin embargo, su especificidad es mayor, ya que a diferencia del método convencional ninguno de los sueros CH reaccionó.

Tabla 6: Características del ELISA basado en péptidos

Péptido	Sensibilidad		Especificidad
	LMC	LC	
Proteína S25			
P3	15%	5%	ND
P4	21,7%	0%	95%
P5	8,6%	15%	ND
P6	13,04%	0%	100%
P7	5%	15%	ND
Proteína S5			
P12	5%	20%	100%
P19	20%	15%	100%
P21	20%	5%	82,5%

5.2. Discusión:

Comprobamos con la realización de este estudio la ampliamente reportada baja especificidad del ELISA con antígeno soluble de *Leishmania* para diagnóstico. En un intento por disminuir el número de falsos positivos, se ha promovido -en lugar del uso de antígenos de parásitos completos- la búsqueda de proteínas inmunodominantes específicas de *Leishmania*, de origen intracelular, altamente conservadas como las proteínas de choque térmico, proteínas ribosomales, entre otras^{18; 19; 20; 21; 31; 40; 41; 42}.

La ventaja de usar proteínas altamente (conservadas como las proteínas ribosomales), es que su estructura será casi idéntica entre especies de *Leishmania* permitiendo detectar anticuerpos contra ésta, independiente de la especie causante de la enfermedad. Sin embargo la principal desventaja radica en que otras especies de microorganismos además de *Leishmania* también podrían inducirlos (reactividad de suero).

A lo largo de la estructura plegada de una proteína se pueden encontrar diversos epítopes B, tanto lineales como conformacionales, de esta manera se pretendió mediante un mapeo epitópico identificar cada secuencia que actúe como epítope, esto con el fin de hacer más específica la detección de anticuerpos. Se han estudiado péptidos derivados de proteínas intracelulares en el diagnóstico de

Resultados

enfermedades parasitarias identificando determinantes inmunogénicos por mapeo epitópico con utilidad para el diagnóstico de Leishmaniasis en humanos y caninos⁴³; ⁴⁴. Además en enfermedad de Chagas⁴⁵; ⁴⁶ y enfermedades por otros agentes infecciosos se han establecido sensibilidades y especificidades de hasta el 100%⁴⁷; ⁴⁸.

En este trabajo se evaluaron dos proteínas ribosomales (S25 y S5) de *Leishmania* y se sintetizaron péptidos que cubrían la totalidad de cada una éstas. El tamizaje inicial de cada uno de los 21 péptidos usados como antígeno en el ELISA mostró que los IR son muy bajos y que solamente unos pocos péptidos permiten identificar muestras positivas (IR > 1). Se preseleccionaron algunos candidatos representando la porción media de la proteína S25 y aquellos hacia los extremos iniciales y finales de la proteína S5 los que mostraron valores IR mayores. A pesar de evaluar estas secuencias con un número mayor de muestras, igualmente las muestras positivas fueron pocas, generando sensibilidades del diagnóstico que no superan el 30%. Esta baja sensibilidad en el diagnóstico de Leishmaniasis puede ser debida posiblemente a que la secuencia peptídica seleccionada no necesariamente coincida con el epítoto antigénico, además de la probabilidad que la antigenicidad de esta molécula sea el resultado del plegamiento de la proteína (epítoto conformacional) y no un epítoto lineal. Cabe resaltar que a pesar que la mayoría de muestras fueron negativas, algunos sueros fueron positivos usando cualquiera de los péptidos preseleccionados, indicando que en algunos individuos se desarrollan anticuerpos contra estas secuencias, coincidentalmente las mismas muestras que mostraron mayores densidades ópticas por el ELISA con ASL. Esto nos lleva a pensar que, o los anticuerpos contra esa secuencia están en muy bajas concentraciones en los demás individuos que resultaron negativos, o que solamente algunos individuos desarrollan estos anticuerpos tras la infección. De cualquier manera bajo estas condiciones, no fue posible seleccionar un péptido con sensibilidades significativas para ser empleado con utilidad en un método de diagnóstico serológico.

Por otro lado, cuando se valoró la reacción cruzada frente a los 3 péptidos con mejores resultados frente a sueros de individuos con Leishmaniasis, se pudo observar que ninguna de las muestras de individuos CH reaccionó contra éstos, y solamente el P4 presentó reacción contra algunos sueros EAI, indicando que su especificidad por la detección de anticuerpos anti-leishmania es alta y por consiguiente podrían mantener algún potencial como candidatos a ser empleados en una prueba diagnóstica.

A pesar que algunos autores reportan la utilidad de un péptido único en el diagnóstico de enfermedades parasitarias, otros reportan que el uso de más de un epítotope aumenta la sensibilidad de la detección; esto posiblemente por la variabilidad antigénica de los parásitos y por la ausencia de antígenos inmunodominantes que hacen que el uso de antígenos combinados de diferentes proteínas aumente la sensibilidad del inmunodiagnóstico⁴⁴. Estos estudios reportan al igual que en este trabajo, una especificidad más alta en el diagnóstico cuando se emplean péptidos sintéticos.

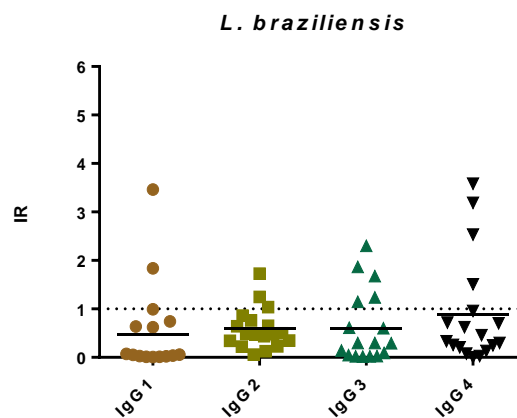
El hecho de que la reacción cruzada de los individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* fuera cero -organismo con mayor identidad en las secuencias peptídicas- y que los sueros EAI reaccionaron en muy baja proporción, nos permite suponer que dicha técnica puede ser útil en el diagnóstico diferencial de la LMC con otras entidades infecciosas con presentación clínica similar como la paracoccidioidomycosis, sífilis terciaria, lepra, micosis, carcinomas, linfomas, rinitis alérgica, perforación del tabique por abuso de drogas entre otras. Cabe resaltar que aunque algunos EAI reaccionaron al P4 como antígeno, generalmente la presentación clínica de las enfermedades autoinmunes no es similar a la Leishmaniasis, así que la probabilidad de diagnosticar erróneamente con Leishmaniasis a un paciente con EAI es mínima. En resumen, al emplear péptidos sintéticos para el diagnóstico de LMC la detección de muestras como falsos positivos disminuye ampliamente comparado con el diagnóstico con ASL.

6. Determinación de subclases de IgG

6.1. ELISA convencional para subclases

Finalmente, con el fin de establecer las subclases de IgG que se generan en los pacientes, en respuesta a la infección por *Leishmania* y que son detectados por el método de ELISA, se valoró inicialmente el perfil de subclases de inmunoglobulina G (IgG1, 2, 3 y 4), con las muestras de pacientes con LMC y el ELISA convencional (Ver gráfica 10).

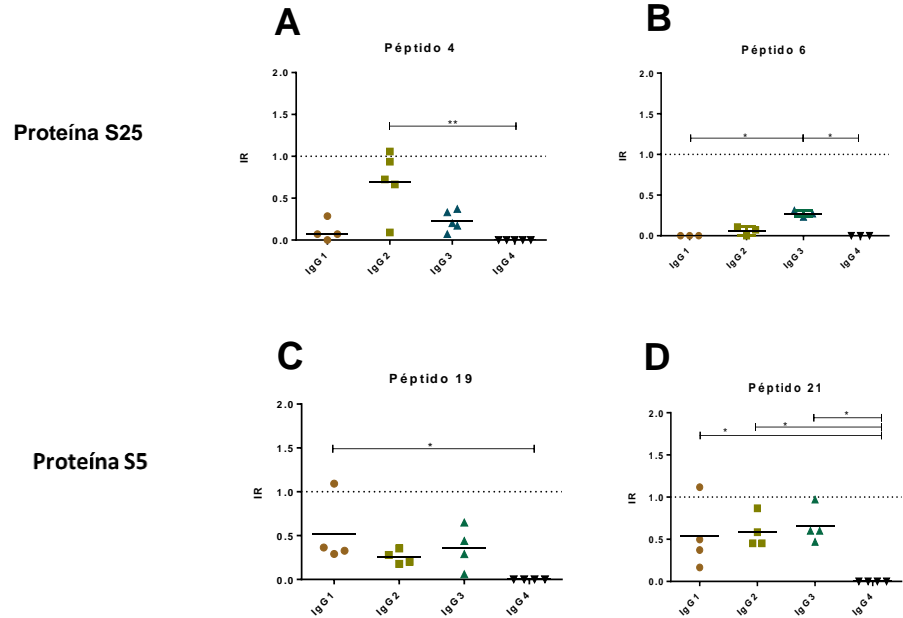
Gráfica 10



Se puede destacar de la detección de subclases IgG, que en las muestras (LMC) empleadas prevalece la IgG3 cuando se usa ASL como antígeno (Gráfica 10).

Cuando se determinan las subclases de IgG en los péptidos seleccionados con los sueros para cada péptido que resultaron positivos frente a el ASL, se evidencia que la mayoría de las muestras resulta bajo el IR 1 por lo tanto la detección de las subclases de IgG resulta menos sensible que la detección de la IgG total (Gráfica 11). Además resaltamos que para el P4 prevaleció la IgG2, para el P6 la IgG3 fue mayor y para los 4 péptidos la IgG4 estuvo en niveles muy bajos.

Gráfica 11



Determinación de subclases de IgG en A) Péptido 4 ($p=0.0038$), B) péptido 6 ($p=0.0045$), C) Péptido 19 ($p=0.0041$) y D) Péptido 21 ($p=0.0111$).

6.2. Discusión:

La inmunoglobulina G (IgG) se divide en 4 subclases, cuyas diferencias radican principalmente de la región bisagra de sus cadenas pesadas denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 presentándose en este mismo orden -de mayor a menor concentración- en el suero humano en condiciones normales, sin embargo en el curso de una enfermedad infecciosa estas proporciones varían de acuerdo a la naturaleza del antígeno, principalmente.

En la infección por *Leishmania*, se ha reportado que en el curso de la LC prevalecen los anticuerpos IgG1 e IgG3. Se ha visto igualmente que las subclases predominantes en pacientes con LMC son principalmente IgG3 y en menor proporción IgG1, con bajas concentraciones o ninguna de IgG2 e IgG4^{33; 34; 35; 49}. Dichos reportes coinciden con nuestros hallazgos en donde los anticuerpos IgG1 e IgG3 presentaron mayores niveles que las otras subclases, en sueros de pacientes con LMC cuando se usa ASL como antígeno. Las diferencias en la región bisagra de las subclases de IgG determinan la flexibilidad del anticuerpo siendo IgG3>IgG1>IgG4>IgG2 flexibles⁵⁰. Esta característica influye en la función efectora de cada una de éstas, resultando en la capacidad de unión a la fracción C1q y por lo tanto, la capacidad de activación del complemento así: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4.

Resultados

Además, IgG3 e IgG1 igualmente representan la mayor afinidad por los receptores de la porción Fc, lo cual a su vez favorece el proceso de opsonización. Por lo tanto, en el curso de una Leishmaniasis tegumentaria las subclases de IgG predominantes pueden estar generando tanto la activación del complemento en la membrana parasitaria, como promoviendo la opsonización de los parásitos por los macrófagos facilitando de este modo la invasión a las células blanco.

Pedras *et al*^{β2} reportaron que la especificidad del diagnóstico aumenta usando IgG1 e IgG3, comparado con IgG total en el diagnóstico de LM y LMC además, señala que la IgG3 es la primera en decaer sus niveles después de la cura. Riveiro *et al*^{β1} señalan que el uso de IgG total tiene mejores resultados que las subclases IgG1 e IgG2 en el diagnóstico de LV, mientras que ANAM *et al*^{β2} por el contrario reporta mayor especificidad utilizando IgG3 en el diagnóstico de LV, todos éstos estudios usando ASL como antígeno en el ELISA.

7. Conclusiones

El ELISA sigue siendo un método ampliamente usado en diagnóstico por su relativa facilidad y economía, lo que lo hace accesible a sitios remotos donde no haya disponibilidad de equipos complejos, zonas donde enfermedades como la Leishmaniasis son endémicas y en donde se requiere un diagnóstico a tiempo para un tratamiento oportuno, evitando así secuelas irreversibles en los afectados. Sin embargo, el empleo de ELISA con antígenos de parásitos completos genera altos falsos positivos causando el tratamiento contra la Leishmaniasis en individuos con otras entidades y con él los efectos adversos que conlleva además de la no resolución de su afección.

El ELISA basado en péptidos ha mostrado tener la capacidad de aumentar la especificidad de la detección, disminuyendo los falsos positivos y evitando por lo tanto la administración de tratamiento innecesario.

De este trabajo se puede concluir que el ELISA como método diagnóstico de Leishmaniasis usando ASL como antígeno presenta alta sensibilidad variando entre especies empleadas, pero muy baja especificidad especialmente por reacción cruzada con individuos con Enfermedad de Chagas.

El ELISA basado en péptidos de la proteína ribosomal S25 de *L. braziliensis* permitió seleccionar a P4 y P6 como secuencias en donde se encuentra un posible epítotope de células B. Igualmente pudo seleccionar como posible epítotope al P12, derivado de la proteína ribosomal S5 de *L. braziliensis* por sus reacciones con más sueros evaluados comparados con los demás péptidos.

La sensibilidad del diagnóstico de Leishmaniasis del ELISA basado en los péptidos evaluados en este estudio es baja, sin embargo, las especificidades de dichas técnicas son altas representadas en el bajo número de falsos positivos.

Finalmente, reportamos en este estudio que la IgG3 prevalecen en la LMC frente a ASL en el ELISA.

8. Bibliografía

- 1 WHO | New Technical Report Series on the Control of Leishmaniasis. **WHO**, 2011-04-07 14:36:00 2012. Disponible en: < http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media/integrated_media_2010_leishmaniasis/en/ >.
- 2 Leishmaniasis - Pan American Health Organization - Organización Panamericana de la Salud. 2012. Disponible en: < [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3835&Itemid=4098\(=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3835&Itemid=4098(=en) >.
- 3 MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, C. Guia, Protocolo para la vigilancia en salud pública de leishmaniasis., Disponible en: < <http://dssa.media.vcb.com.co/dssa.gov.co/documentos/Protocolos-Vectores-INS/protocolo-LEISHMANIASIS.pdf> >.
- 4 INTITUTO NACIONAL DE SALUD, C. Protocolo de Vigilancia de la Leishmaniasis. 2007. Disponible en: < <http://www.dadiscartagena.gov.co/web/images/docs/saludpublica/leishmaniasis-f.pdf> >.
- 5 SALUD, I. N. D. Informe final Leishmaniasis Colombia. 2013. Disponible en: < <http://www.ins.gov.co:81/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/LEISHMANIASIS%202013.pdf> >.
- 6 GUERRA, J. A. et al. Mucosal Leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e980, 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)1935-2727 (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408116?dopt=Citation> >.
- 7 OSORIO, L. E.; CASTILLO, C. M.; OCHOA, M. T. Mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) panamensis in Colombia: clinical characteristics. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 1, p. 49-52, Jul 1998. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637 (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684627?dopt=Citation> >.

- 8 SARAVIA, N. G. et al. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 1, p. 86-94, Jul 1998. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637 (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684634?dopt=Citation> >.
- 9 DANESHBOD, Y. et al. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 4, p. 478-82, Apr 2011. ISSN 1543-2165 (Electronic)0003-9985 (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466365?dopt=Citation> >.
- 10 DINIZ, J. L.; COSTA, M. O.; GONCALVES, D. U. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 77, n. 3, p. 380-4, Jun 2011. ISSN 1808-8686 (Electronic)1808-8686 (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739015?dopt=Citation> >.
- 11 BARROSO-FREITAS, A. P. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 4, p. 383-9, Apr 2009. ISSN 1878-3503 (Electronic)0035-9203 (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211118?dopt=Citation> >.
- 12 ROMERO, G. A. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* or *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Brazil. **Acta Trop**, v. 93, n. 1, p. 49-56, Jan 2005. ISSN 0001-706X (Print)0001-706X (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589797?dopt=Citation> >.
- 13 MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL, C. Guía de atención integral de leishmaniasis. 2010. Disponible en: <
<http://www.risaralda.gov.co/sitio/salud/images/stories/files/guia%20de%20atencion%20integral%20de%20leishmaniasis%202010.pdf> >.
- 14 VARGAS-DUARTE, J. J. Evaluación por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infeccionados con *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. **Revista de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 641-652, 2009. Disponible en: <
<http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n4/v11n4a15.pdf> >.
- 15 MALCHIODI, E. L. et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clin Exp Immunol**, v. 97, n. 3, p. 417-23, Sep 1994. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104

Bibliografía

- (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082296?dopt=Citation> >.
- 16 ODONE R, M. J., CANESE A, VELÁZQUEZ GR, MEZA T, MORÁN M. Seguimiento clínico y serológico de pacientes tratados de leishmaniosis cutánea. **mem. Inst. Investig. Cienc. Salud**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2007. Disponible en: <
<http://www.iics.una.py/n/pdf/revista/50.pdf> >.
- 17 VEXENAT ADE, C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-85, May-Jun 1996. ISSN 0036-4665 (Print)0036-4665. Disponible en: < <http://dx.doi.org/> >.
- 18 SOTO, M. et al. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 3, n. 4, p. 387-91, Jul 1996. ISSN 1071-412X (Print)1071-412X (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8807201?dopt=Citation> >.
- 19 KAUR, J.; KAUR, S. ELISA and western blotting for the detection of Hsp70 and Hsp83 antigens of *Leishmania donovani*. **J Parasit Dis**, v. 37, n. 1, p. 68-73, Apr 2013. ISSN 0971-7196 (Print)0971-7196. Disponible en: <
<http://dx.doi.org/10.1007/s12639-012-0133-0> >.
- 20 LAKHAL, S. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude *Leishmania* histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 9, p. 1487-91, Sep 2012. ISSN 1556-679x. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00257-12> >.
- 21 CELESTE, B. J. et al. Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 5, p. 860-5, May 2014. ISSN 0002-9637. Disponible en: <
<http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0623> >.
- 22 ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 552-7, Dec 2006. ISSN 1471-4922 (Print)1471-4922 (Linking). Disponible en: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023215?dopt=Citation> >.
- 23 BARI, A. U. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 16, p. 24-27, 2006. Disponible en: <
http://www.jpada.org.pk/jan%20mar%202006/6cl_an_overview_of_history_r_a.pdf >.

- 24 DE ALMEIDA, M. C. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861-70, Oct 2003. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762510?dopt=Citation> >.
- 25 MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2010. Disponible en: < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf >.
- 26 AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. **Acta Trop**, v. 105, n. 1, p. 1-9, Jan 2008. ISSN 0001-706X (Print)0001-706x. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.003> >.
- 27 BRITO, M. E. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 2, p. 203-6, Mar-Apr 2001. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203. Disponible en: < <http://dx.doi.org/> >.
- 28 GALVAO-CASTRO, B. et al. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, v. 56, n. 1, p. 58-66, Apr 1984. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104 (Linking).
- 29 WOELBING, F. et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **J Exp Med**, v. 203, n. 1, p. 177-88, Jan 23 2006. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007 (Linking).
- 30 VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur J Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 115-22, Mar-Apr 2007. ISSN 1167-1122 (Print)1167-1122 (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337393?dopt=Citation> >.
- 31 REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitol Today**, v. 16, n. 6, p. 246-50, Jun 2000. ISSN 0169-4758 (Print)0169-4758 (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827430?dopt=Citation> >.
- 32 JUNQUEIRA PEDRAS, M. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 47, n. 3, p. 477-85,

Bibliografía

- Nov 2003. ISSN 0732-8893 (Print)0732-8893 (Linking). Disponible en: < <http://dx.doi.org/> >.
- 33 OZBILGE, H. et al. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. In: (Ed.). **J Med Microbiol**. England, v.55, 2006. p.1329-31. ISBN 0022-2615 (Print)0022-2615 (Linking).
- 34 EL AMIN, E. M.; WRIGHT, E. P.; VLUG, A. Characterization of the humoral immune response in Sudanese leishmaniasis: specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. **Clin Exp Immunol**, v. 64, n. 1, p. 14-9, Apr 1986. ISSN 0009-9104 (Print)1365-2249 (Electronic).
- 35 AGUDELO LÓPEZ, S. D. P. et al. Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. **Iatreia**, v. 13, n. 3, 25/03/2000 2000. ISSN 2011-7965. Disponible en: < <http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/357> >
- 36 WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am J Trop Med Hyg**, v. 36, n. 3, p. 489-96, May 1987. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637. Disponible en: < <http://dx.doi.org/> >.
- 37 CELESTE, B. J. et al. Leishmania infantum heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 11, p. 1591-3, Nov 2004. ISSN 0100-879X (Print)0100-879X (Linking). Disponible en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517072?dopt=Citation> >.
- 38 GUIMARAES, M. C. et al. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. **Bull World Health Organ**, v. 67, n. 6, p. 643-8, 1989. ISSN 0042-9686 (Print)0042-9686. Disponible en: < <http://dx.doi.org/> >.
- 39 DE CARVALHO, C. A. et al. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. **Acta Trop**, v. 125, n. 2, p. 128-36, Feb 2013. ISSN 0001-706x. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.010> >.
- 40 MONTOYA, Y. et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 6, p. 674-6, Nov-Dec 1997. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203. Disponible en: < <http://dx.doi.org/> >.

- 41 ABASS, E. et al. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2322, 2013. ISSN 1935-2727. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002322> >.
- 42 SOUZA, A. P. et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66110, 2013. ISSN 1932-6203. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066110> >.
- 43 FARIA, A. R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 9, p. e1310, Sep 2011. ISSN 1935-2727. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001310> >.
- 44 COSTA, M. M. et al. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1622, 2012. ISSN 1935-2727. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001622> >.
- 45 BOTTINO, C. G. et al. Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 568, 2013. ISSN 1471-2334. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-568> >.
- 46 BHATTACHARYYA, T. et al. Development of Peptide-based lineage-specific serology for chronic chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2892, May 2014. ISSN 1935-2727. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002892> >.
- 47 METZ, G. E. et al. Development of a peptide ELISA for the diagnosis of Equine arteritis virus. **J Virol Methods**, v. 205c, p. 3-6, May 4 2014. ISSN 0166-0934. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.04.018> >.
- 48 INTAPAN, P. M. et al. Evaluation of IgG4 subclass antibody detection by peptide-based ELISA for the diagnosis of human paragonimiasis heterotrema. **Korean J Parasitol**, v. 51, n. 6, p. 763-6, Dec 2013. ISSN 0023-4001. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2013.51.6.763> >.
- 49 FAGUNDES-SILVA, G. A. et al. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 10, p. 486-91, Oct 2012. ISSN 0141-9838. Disponible en: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x> >.

- 50 ROUX, K. H.; STRELETS, L.; MICHAELSEN, T. E. Flexibility of human IgG subclasses., 1997-10-01 1997. Disponibile en: < <http://www.jimmunol.org/content/159/7/3372.short> >.
- 51 RIBEIRO, F. C. et al. Use of ELISA employing Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Vet Parasitol**, v. 148, n. 3-4, p. 200-6, Sep 30 2007. ISSN 0304-4017 (Print)0304-4017 (Linking). Disponibile en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689193?dopt=Citation> >.
- 52 ANAM, K. et al. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of Leishmania donovani antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, n. 2, p. 231-5, Mar 1999. ISSN 1071-412X (Print)1071-412X (Linking). Disponibile en: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066659> >.
- 53 KIM, JY et al Immunoproteomics of *Brucella abortus* as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.15;160(3-4), p. 218-24 Aug 2014.
- 54 RAMOS CA, et al Molecular and antigenic characterisation of ribosomal phosphoprotein PO from *Babesia bovis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v 104. n 7. p. 998-1002. Nov 2009.
- 55 LÓPEZ BP, et al. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the Trypanosoma cruzi ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB* v. 15. n. 14. p. 2602-12 Dec 2001.
- 56 DESBOS A, et al. Autoantibodies directed against ribosomal proteins in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study. *Autoimmunity*. v.35, n.7, p 427-34, Nov 2002.
- 57 de SOUZA CM. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol*. v. 34, n 1, p. 1-7, Jan 2012.
- 58 SHARMA U. et al. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*. v.47, n.6, p. 412-23. Jun 2009.
- 59 FARIA RV. et al.Epitope mapping of the HSP83.1 protein of Leishmania braziliensis discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. v.21, p.949-959. May 2014
- 60 MENEZES-SOUZA D. et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of Leishmania (viannia) braziliensis and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *PLoS One*. v12., n.9(6), Jun 2014.

9. Anexos

9.1. Anexo 1 consentimiento informado



Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia

Consideraciones Éticas
Hoja de Consentimiento
Número 1

Las implicaciones de mi participación, el propósito del estudio de investigación, los métodos y medios como va a ser llevado a cabo y los inconvenientes que razonablemente pudiesen presentarse, han sido explicados a mí por el personal asociado al proyecto titulado **“Péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania spp* en leishmaniasis mucocutánea: utilidad diagnóstica”** Entiendo que este proyecto desarrollado por personal del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, tiene como objetivo la detección de anticuerpos séricos dirigidos contra péptidos sintéticos, mediante el tamizaje por ELISA de sueros provenientes de pacientes con las formas clínicas mucocutánea y cutánea difusa de la enfermedad. Además he tenido la oportunidad de hacer preguntas con respecto al estudio, siendo estas contestadas a mi completa satisfacción. Acorde a lo anterior, con total capacidad para decidir y habiendo cumplido 18 años de edad doy mi consentimiento voluntario para la donación de sangre.

Procedimientos a seguir

Si usted es seleccionado y está de acuerdo en participar en este estudio, previa evaluación médica, se le solicitará la donación de dos (2) muestras de sangre de 5 mL, tomadas en una misma venopunción. Estas muestras serán la fuente de anticuerpos anti-*Leishmania* que serán detectados y caracterizados por medio de la técnica de ELISA.

Período de participación

El tiempo necesario para la donación de la muestra de suero y diligenciamiento del presente consentimiento e historia clínica será de aproximadamente 30 minutos.

Riesgos

Este estudio se considera de bajo riesgo, aunque pudiera presentarse dolor y eritema. El volumen a extraer por muestra es de 5 mL. Se puede tener algo de dolor o enrojecimiento en el área de la venopunción. Además, durante la toma de la muestra de sangre algunas personas ocasionalmente pueden presentar sensación de mareo de lo cual se recuperan de forma espontánea en la mayoría de los casos. En caso de presentar cualquier tipo de reacción local por la veno-punción favor comunicarla al personal de salud donde fue llevado el procedimiento quienes se comunicarán con los investigadores para proceder al tratamiento de la sintomatología de forma inmediata. También puede contactarse de forma con los investigadores del proyecto: Doctores Gabriela Delgado y Magda Melissa Flórez de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Teléfono: 3165000 extensión 14643-14665 ó celular 3156897275).

Beneficios

El presente estudio beneficia a la población en general, ya que la detección de anticuerpos dirigidos contra parásitos del género *Leishmania* podrían ser utilizados como diagnóstico de la enfermedad y por lo tanto favorecería un adecuado y oportuno tratamiento a los pacientes, evitando las complicaciones que se presentan cuando la terapia no se administra a tiempo. La estandarización de la técnica de ELISA indirecta para la detección de la leishmaniasis permitiría diagnosticar pacientes para quienes las pruebas diagnósticas tradicionales resultan negativas. La Leishmaniasis afecta a un gran número de personas en nuestro país. Su participación en este estudio es de gran importancia ya que estaría contribuyendo al desarrollo de una herramienta encaminada al mejoramiento de la calidad de vida de los colombianos.

Confidencialidad

Su nombre no será usado en ningún informe de este estudio.

Son causales de retiro de voluntarios del estudio sin previo consentimiento

1. Falta de colaboración con los procedimientos descritos en este documento.
2. Comportamiento inusual que a criterio de los investigadores y monitores se salgan de las normas de buena conducta.

Hallazgos nuevos de importancia para su salud

Cualquier información adicional e importante encontrada durante el estudio, que pudiese resultar importante para su salud, le será comunicada inmediatamente.

Retiro del estudio por parte del voluntario

Se le recuerda que su participación es totalmente voluntaria. Nosotros esperamos que usted participe en este estudio sabiendo que usted no será sancionado ni objeto de represalia alguna si decide retirarse.

Puntos de contacto

Cualquier anomalía que usted encuentre durante el periodo del estudio usted la puede reportar a los Doctores Gabriela Delgado y Magda Melissa Flórez de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Teléfono: 3165000 extensión 14643-14665 ó celular 3156897275)..

IMPORTANTE: Si existe alguna parte de este documento que no entienda, por favor pregunte a uno de los investigadores antes de firmar.

Declaro haber recibido toda la información pertinente a este estudio. Consciente de todo lo anterior, decido participar voluntariamente en este estudio. Mi participación como voluntario implica la donación de muestras de sangre tomadas de las venas de alguno de mis dos brazos, así como el seguimiento por parte del grupo de investigadores del proyecto. Soy consciente que la sangre que donaré y la colaboración que prestaré, será utilizada con fines de ésta investigación solamente y que nadie obtendrá ningún tipo de lucro con ellas. Soy también consciente que la donación de esta cantidad de sangre no representa ningún peligro para mi salud y que el procedimiento para la toma de la muestra es seguro.

Voluntario #-----

_____ (Apellidos) _____
(Nombres)

Firma e identificación del voluntario

Fecha y Lugar

_____ (Apellidos) _____
(Nombres)

Firma

9.2. Anexo 2. Aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

COMITÉ DE ÉTICA **FACULTAD DE
CIENCIAS**

Estudiante
Magda Melissa Flórez Martínez
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional

Respetada Estudiante:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 21 de Agosto de 2012 (Acta 05), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted.

Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: Péptidos sintéticos de proteínas ribosomales de *Leishmania spp* en leishmaniasis mucocutánea: utilidad diagnóstica.

Responsables: **Magda Melissa Flórez Martínez** (Estudiante Maestría en Ciencias – Microbiología). Directora: Lucy Gabriela Delgado Murcia (Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, COL0068495). Co-investigadores: Fanny Guzmán (síntesis de péptidos, Grupo “Núcleo de Biotecnología Carauma”, Universidad Católica de Valparaíso – Chile), Concepción Judith Puerta Bula (provisión de muestras serológicas, Grupo “Enfermedades Infecciosas”, Universidad Javeriana, COL0004317).

Observaciones:
El presente trabajo busca desarrollar una metodología diagnóstica más sensible y específica que los métodos actualmente disponibles para el diagnóstico de leishmania mucocutánea (LMC).

Se analizarán péptidos sintéticos derivados de proteínas ribosomales de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, en casos de LMC, mediante la detección de anticuerpos séricos por ELISA.

Se trata de una investigación de riesgo mínimo (Resol. 008430 de 1993, MSP), en la cual se requiere la donación de dos muestras (en total 5 mL) de sangre periférica obtenida por venopunción. Se anexa el protocolo de consentimiento informado, el cual recoge los aspectos más relevantes para este tipo de intervención.

Es necesario conocer y practicar protocolos adecuados para el manejo del riesgo biológico inherente a este tipo de investigación.

Concepto: Aprobado.

Cordialmente,



LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

145 años
Innovando

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE CIENCIAS, Edificio 450, 4º piso, Oficina 400
Teléfono: (57-1) 316 5045 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 14666 Fax: 14456
Correo electrónico: lfospinag@unal.edu.co / Bogotá, Colombia, Sur América