



Universidad Internacional Sek

Facultad de Ciencias Ambientales

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

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

Realizado por:

Naraly Arianna Ramos Figueroa

Director del proyecto:

PhD. Graciela Uzcanga Urbina

Como requisito para la obtención del título de:

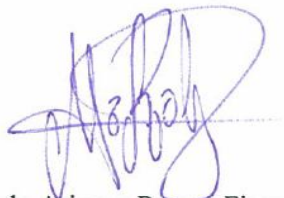
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 8 de agosto de 2016

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, NARALY ARIANNA RAMOS FIGUEROA, con cedula de identidad # 172585756-7, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográfica que se incluyen en este documento.

A través de la declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Naraly Arianna Ramos Figueroa

CC: 172585756-7

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“EVALUACIÓN DE LAS HISTONAS DE *Leishmania mexicana* COMO ANTÍGENOS PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA LEISHMANIASIS EN EQUINOS”

Realizado por:

NARALY ARIANNA RAMOS FIGUEROA

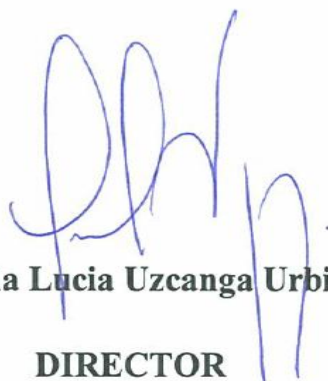
como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por la profesora

GRACIELA LUCIA UZCANGA URBINA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



Graciela Lucia Uzcanga Urbina

DIRECTOR

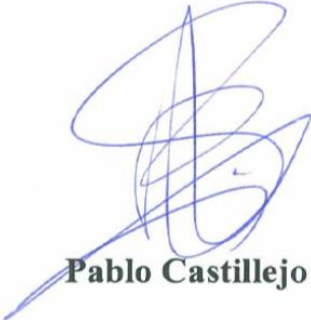
LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:


PABLO CASTILLEJO

SUSANA CHAMORRO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



Pablo Castillejo



Susana Chamorro

Quito, 5 de Agosto del 2016

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico a todas las personas que me apoyaron e incentivaron para lograr cumplir este desafío, principalmente a mi mis padres Wilma y Miguel , a mis hermanos Ceci y Miky y a toda mi familia que me han dado su respaldo durante todos estos años y me impulsaron a seguir adelante con mis estudios.

Agradecimiento

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante esta aventura que hoy está llegando a su fin.

Al maravilloso ser que me dio la vida, gracias MAMÁ por enseñarme que todo lo que me proponga en esta vida puedo lograrlo, tú infinito amor, confianza y apoyo son mi principal motivación para seguir adelante en este mundo.

A mi padre por creer en mí, apoyarme y ayudarme a cumplir este desafío.

A mi hermano y hermana sus palabras de aliento fueron de gran ayuda cuando más lo necesite.

Gracias a mis amigas/os que estuvieron presentes en los momentos que más necesite de su ayuda.

A la Dra. Graciela Uzcanga quien planteo el tema del siguiente trabajo sus conocimientos, ayuda, paciencia y confianza permitieron el desarrollo del presente trabajo.

También quiero agradecer a todos los profesores que contribuyeron en mi formación académica durante estos años principalmente a Magui y Pablo.

A todos ustedes GRACIAS.

Índice de Contenido

Resumen.....	12
Abstract.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Descripción del tema a desarrollar	14
1.1.1 Vectores biológicos.....	15
1.1.2 Ciclo de vida	17
1.1.3 Huéspedes reservorios.....	20
1.1.4 Manifestaciones clínicas de leishmaniasis.....	21
1.1.5 Métodos de detección de la enfermedad.....	24
1.1.6 Respuesta inmunitaria del huésped	27
1.1.7 Proteínas del parásito	31
1.1.8 Leishmaniasis en América Latina	33
1.1.9 Leishmaniasis en Ecuador	36
1.2 Antecedentes	39
1.2.10 Leishmaniasis en equinos.....	39
1.3 Importancia del estudio	41
1.4 Objetivo general.....	46
2. MARCO TEÓRICO	47
2.1 Histonas.....	47
2.2 Antigenicidad e inmunogenicidad de las histonas de <i>Leishmania</i>	49
2.3 Vacunas desarrolladas utilizando histonas de <i>Leishmania</i>	51
3. METODOLOGÍA.....	52
3.1 Área de estudio	52
3.2 Cultivo del parásito	53
3.3 Aislamiento de Histonas de <i>Leishmania mexicana</i>	54
3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	54
3.5 Método analítico western blot	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	60

4.1	Resultados	60
4.1.1	Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	60
4.1.2	Aislamiento de histonas de <i>Leishmania mexicana</i>	61
4.1.3	Evaluación de histonas de <i>Leishmania mexicana</i>	61
4.2	Discusión	63
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
5.1	Conclusiones	66
5.2	Recomendaciones	67
6.	REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	68

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica de Leishmania.....	14
Figura 2. Phletomus perniciosus.....	16
Figura 3. Esquema del desarrollo y estadios de Leishmania	18
Figura 4. A) macrófago infectado con amastigotes de Leishmania, B) promastigote de Leishmania (N) núcleo, (K) kinetoplasto, (F) flagelo.....	19
Figura 5. Ciclo de Vida de Leishmania	20
Figura 6. Diferentes manifestaciones clínicas producidas por <i>Leishmania</i>	24
Figura 7. Células y citoquinas involucradas en la respuesta inmune, la flecha verde indica una regulación positiva, roja regulación negativa	30
Figura 8. Distribución de leishmaniasis cutánea y mucosa en las Américas en el año 2011. 35	
Figura 9. Casos de Leishmaniasis en Ecuador año (2013-2015).....	38
Figura 10. Número de Casos de <i>Leishmania</i> reportado por provincias en el Ecuador.....	39
Figura 11. <i>Equus asinus</i> infectado con leishmaniasis A) Dermatitis nodular eritematosa, B) Cortes histológicos de piel, C) Cortes histológicos con coloración PAS	41
Figura 12. Histonas	48
Figura 13. Análisis de especificidad de anticuerpos anti-H3 presente en sueros de perros infectados con leishmaniasis visceral.	50
Figura 14. Equinos infectados con <i>Leishmania spp.</i>	53
Figura 15. Western blot histonas de <i>Leishmania mexicana</i>	55
Figura 16. Esquema de western blot	56
Figura 17. Esquema del montaje del sándwich.....	56
Figura 18. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau	57
Figura 19. Esquema de la inmunodetección	58
Figura 20. Cultivo del parásito <i>Leishmania</i> en medio Schneider	60
Figura 21. Gel de Poliacrilamida 15%	61
Figura 22. Western blot de sueros de equinos	62

Figura 23. Reconocimiento de sueros de equinos positivos	63
--	----

Índice de Tablas

Tabla 1. Métodos diagnósticos para detectar Leishmaniasis Cutánea	27
Tabla 2. Métodos diagnósticos de Leishmaniasis visceral	27
Tabla 3. Casos de leishmaniasis Cutánea y mucosa en las Américas (2001-2011).....	34
Tabla 4 . Especies de Leishmania presentes en el Ecuador	37
Tabla 5. Opciones Terapéuticas de leishmaniasis cutánea y mucosa en las Américas presentados según su forma clínica, indicación y nivel de evidencia.	43
Tabla 6. Frecuencia de los efectos adversos clínicos, de laboratorio y electrocardiográficos en los pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con antimonios pentavalentes e isetionato de pentamidina.....	44

Resumen

Leishmaniasis es una enfermedad producida por un parásito protozoo perteneciente a la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*. Los parásitos son transmitidos por la picadura de moscas de arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, los cuales son endémicos de zonas tropicales y subtropicales. Los perros infectados con *Leishmania infantum* generan anticuerpos anti-histonas que son capaces de reconocer solo las histonas del parásito. Actualmente en Ecuador no se ha realizado ningún estudio acerca de la respuesta inmunitaria de equinos infectados con *Leishmania*. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó mediante western blot, si las histonas H3 y H4 son reconocidas por sueros de equinos infectados con *Leishmania*, por lo cual se analizaron 18 sueros de equinos tomados en la provincia del Napo Ecuador, once equinos estaban infectados con *Leishmania amazonensis* y se demostró su infección utilizando PCR y microscopía. Diez sueros de equinos infectados, reconocieron la histona H3 con una frecuencia de (90.9%) y siete sueros reconocieron la H4 con una frecuencia de (64%). Por lo cual, se propone que el uso de histonas de *Leishmania* para el diagnóstico serológico de equinos puede ser de gran utilidad. Sin embargo los sueros de equinos aparentemente sanos, también reconocieron la histona H3.

Palabras claves: Leishmaniasis, Equinos, Histonas

Abstract

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan parasite of the family Trypanosomatidae, genus *Leishmania*. These parasites are spread by bites of sand flies from genus, *Phlebotomus* or *Lutzomyia*. These biological vectors are endemic from tropical and subtropical areas. Dogs infected with *Leishmania infantum* generate antibodies anti-histone that only recognized histones from parasite. In addition, any study in Ecuador has been made about immune response from equines infected with parasite *Leishmania*. This study evaluated, if the histones H3 and H4 are recognizing by sera from equines infected with *Leishmania*, using western blot. For that, we analyzed eighteen sera from equines taken in the province of Napo Ecuador. Eleven equines were infected with *Leishmania amazonensis* as has been demonstrated by PCR and observation direct to the microscopy. Ten sera from infected equines immuno recognized histone H3 (90.9%), and seven sera immuno recognized H4 (64%). Whereby, we proposed the use of histones from *Leishmania* for serological diagnosis in equine could be useful. However, sera from equines which were apparently healthy, immune recognized histone H3.

Keywords: leishmaniasis, equine, histone

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del tema a desarrollar

Leishmaniasis es una enfermedad producida por la infección de un parásito protozoario perteneciente a la familia Trypanosomatidae (orden Kinetoplastida) dentro del cual encontramos al género *Leishmania* (The Center for Food Security Public Health, 2010). La Leishmaniasis es endémica en 98 países, se estima que a nivel mundial más de 12 millones de personas están infectadas con *Leishmania* y 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2014). En la figura 1 se puede observar la clasificación taxonómica de *Leishmania*.

Reino:Protozoa (Goldfuss,1818)
Subreino:Biciliata (Cavalier-Smith,2003)
Phylum:Euglenozoa (Cavalier-Smith,1981)
Clase:Kinetoplastea (Hoigberg,1963)
Subclase:Metakinetoplastina (Moreira,2004)
Orden:Trypanosomatida(Kent,1880;Hollande,1952)
Género: *Leishmania* (Ross,1903)
Subgénero: *leishmania* (Ross,1903), presente en el nuevo y viejo mundo
Subgénero: *viannia* (Lainson y Shaw,1987) ,presente en el nuevo mundo

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania*.

Fuente: (Carrión Herrero, 2007)

La Leishmaniasis es endémica en zonas tropicales y subtropicales, por lo cual podemos encontrarla en Asia, Medio Oriente, América Latina y la región Mediterránea. Los parásitos

de *Leishmania* son transmitidos la picadura de moscas de arena (The Center for Food Security Public Health, 2010).

Dentro del género *Leishmania* existen dos subgéneros que son: *leishmania* que se encuentra principalmente en el viejo mundo (Europa, Asia, África) y el subgénero *viannia* presente en el nuevo mundo (continente Americano) (Hadman, 1992), se diferencian por el lugar en donde crecen y se desarrollan en los flebótomos (The Center for Food Security Public Health, 2010) .

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2010) clasifica a la enfermedad de la siguiente forma; subgénero *leishmania* visceral las especies: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. leishmania* cutánea tenemos las especies: *L. major*, *L. tropica*, *L. killicki*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. garnhami*, *L. amazonensis*; subgénero *L.viannia* leishmaniasis cutánea, las especies: *L. braziliensis* , *L. guayanensis*, *L. panamensis* ,*L. shawi* , *L. naiffi* , *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana*, *L. colombiensis*, *L. vianna*; en mucosa las especies: *L. braziliensis*, *L. panamensis*. Actualmente se ha identificado 30 especies de *Leishmania* de las cuales 20 especies son patógenas en los mamíferos (The Center for Food Security Public Health, 2010).

1.1.1 Vectores biológicos

La transmisión del parásito se produce principalmente por vectores biológicos hembra, como son las moscas de arena, de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (The Center for Food Security Public Health, 2010) generalmente viven en micro hábitats húmedos, ricos en materia orgánica, no son acuáticos. Su desarrollo depende de la temperatura ambiente en la que se encuentren, a bajas temperaturas se retarda su crecimiento, mientras que a altas temperaturas el tiempo disminuye (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En la Figura 2 se puede observar a dos moscas hembras alimentándose, una de ellas contiene el abdomen repleto de sangre.



Figura 2. *Phlebotomus perniciosus*.

Fuente: (Gálvez Esteban , 2011)

Los vectores biológicos (flebotomos) son más activos al amanecer, atardecer y durante la noche, al no ser organismos endémicos de climas fríos, el parásito *Leishmania* puede sobrevivir en estos climas debido a que utilizan como huéspedes a mamíferos (The Center for Food Security Public Health, 2010).

Los flebotomos macho no participan en la transmisión de la enfermedad, debido a que su aparato bucal está poco desarrollado, y no pueden perforar la piel al contrario de los flebotomos hembra donde la mayoría de las especies se alimentan de sangre. La preferencia alimentaria de estos vectores biológicos, depende de la especie y la disponibilidad de huéspedes que exista en la zona (Organización Mundial de la Salud, 2010).

La leishmaniasis es principalmente transmitida por vectores, sin embargo se ha encontrado casos de transmisión entre personas, tales como, la transmisión vertical de madre a hijo (congénita), la venérea como la transfusión sanguínea (The Center for Food Security Public Health, 2010).

El estudio de los vectores biológicos (flebótomos) hospedadores del parásito *Leishmania* es muy importante debido a que estos participa directamente en la epidemiología de la leishmaniasis (Organización Mundial de la Salud, 2010).

1.1.2 Ciclo de vida

El parásito *Leishmania* tiene un ciclo de vida dimórfico es decir: involucra a huéspedes vertebrados (principalmente animales salvajes) y vectores biológicos (flebótomos) (Alexander, Satoskar, & Russell, 1999), sin embargo el ser humano y los animales domésticos llegan hacer huéspedes accidentales de este parásito (The Center for Food Security Public Health, 2010).

Las especies del subgénero *leishmania* crecen el tubo digestivo (desarrollo suprapilórico) de vectores naturales, mientras que en las especies del subgénero *viannia*, se desarrollan tanto en el intestino medio como en el intestino posterior (desarrollo peripilórico) (Organización Mundial de la Salud, 2010).

El parásito presenta varios estadios morfológicos a lo largo de su ciclo de vida, los principales son: promastigote flagelado y amastigote no flagelado el cambio de una fase a otra, se conoce como metacicloogénesis (Sacks D. L., 1989).

La forma promastigote se desarrolla en el insecto vector, dentro de esta fase existen dos subtipos: promastigote procíclico, forma flagelada, replicativa, no infectiva y el promastigote metacíclico, forma infectiva, no replicativa, la cual dentro del huésped vertebrado infecta principalmente a los macrófagos (Alexander, Satoskar, & Russell, 1999).

En el tracto intestinal del insecto vector se desarrollan los promastigotes procíclicos, que se van replicando hasta llegar al aparato bucal del insecto, donde se encuentran en fase metacíclica o de virulencia y son liberados junto con saliva del insecto vector dentro del huésped vertebrado, en el momento que el flebótomo hembra ingiere sangre del huésped vertebrado (Sacks D. L., 1989; Schlein, 1993; Sacks & Kamhawi ,2001), como se muestra en la figura 3 la metacicloogénesis del parásito.

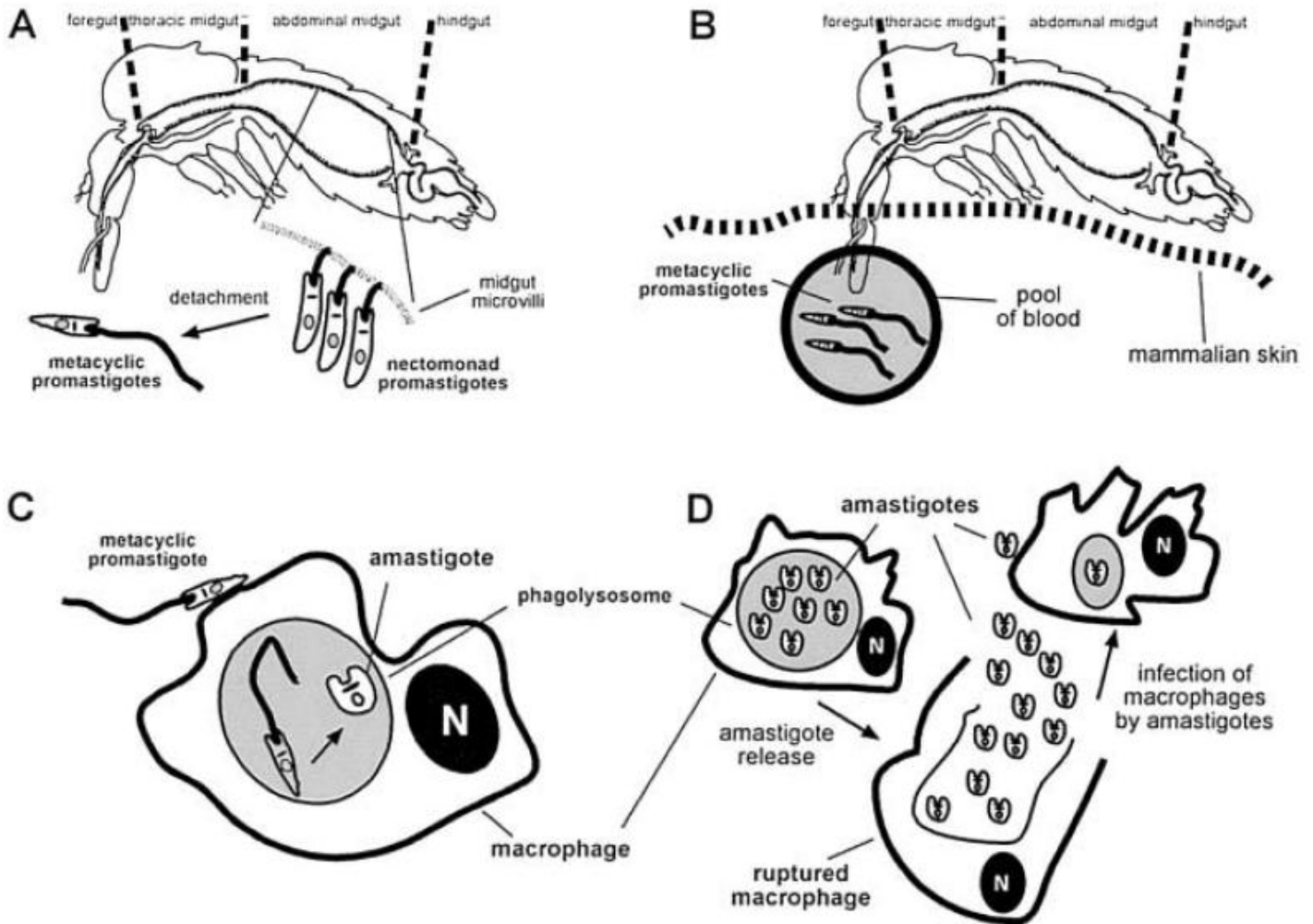


Figura 3. Esquema del desarrollo y estadios de *Leishmania*

Fuente: (Ilg, 2001)

Los amastigotes pueden dividirse por fisión binaria o fisión múltiple, mientras que en los promastigotes la reproducción es asexual, sin embargo en la forma metacíclica la reproducción es principalmente por fisión binaria, también se ha reportado que existe reproducción sexual, mediante intercambio genético (Minero, Chinchilla, Guerrero, & Castro, 2004; Stuart, et al., 2008).

Cuando los promastigotes metacíclicos ingresan al huésped vertebrado, estos son fagocitados por macrófagos en donde cambian a amastigotes, la multiplicación de los amastigotes y el incremento excesivo de estos provoca la ruptura del macrófago, de esta forma son liberados y continúan infectando a otros macrófagos (Cunningham, 2002), por lo cual los

órganos que contienen gran cantidad de macrófagos y otras células fagocíticas son los más afectados, entre estos tenemos: el bazo, el hígado y la medula ósea (Carrión Herrero, 2007).

En la figura 4A se puede observar un macrófago infectado con amastigotes y en la 4B un promastigote procíclico.

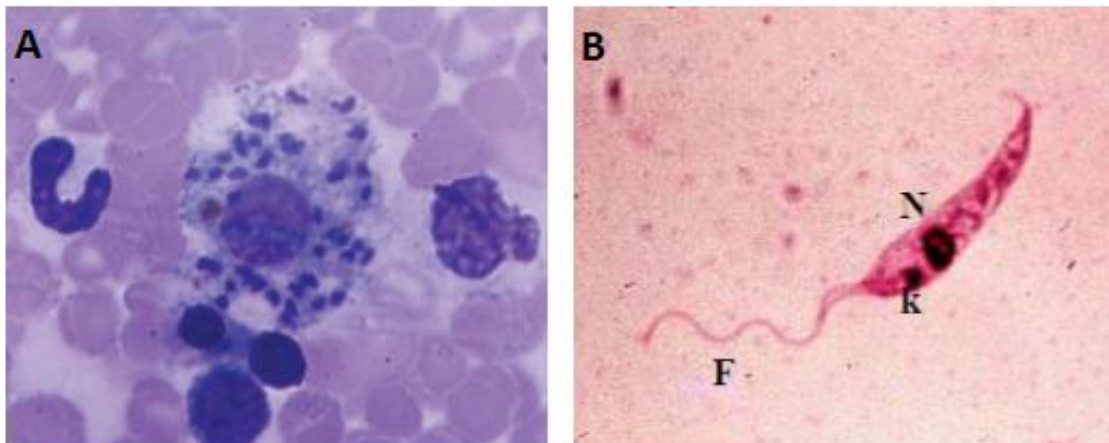


Figura 4. A) macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania*, B) promastigote de *Leishmania* (N) núcleo, (K) kinetoplasto, (F) flagelo

Fuente: (Gálvez Esteban , 2011) (González García, 2003)

Los vertebrados hospedadores del parásito *Leishmania*, tiene en su sangre una elevada cantidad de amastigotes, por lo que, cuando un flebótomo ingiere sangre infectada con el parásito, estos se desarrollarán en el intestino medio del insecto vector donde cambiarán a promastigotes procíclicos y seguirán su ciclo de vida (Hadman, 1992).

Como se puede observar en la figura 5 el ciclo de vida del parásito *Leishmania* descrito por la CDC (2015) cuando infecta a un ser humano o cualquier otro mamífero.

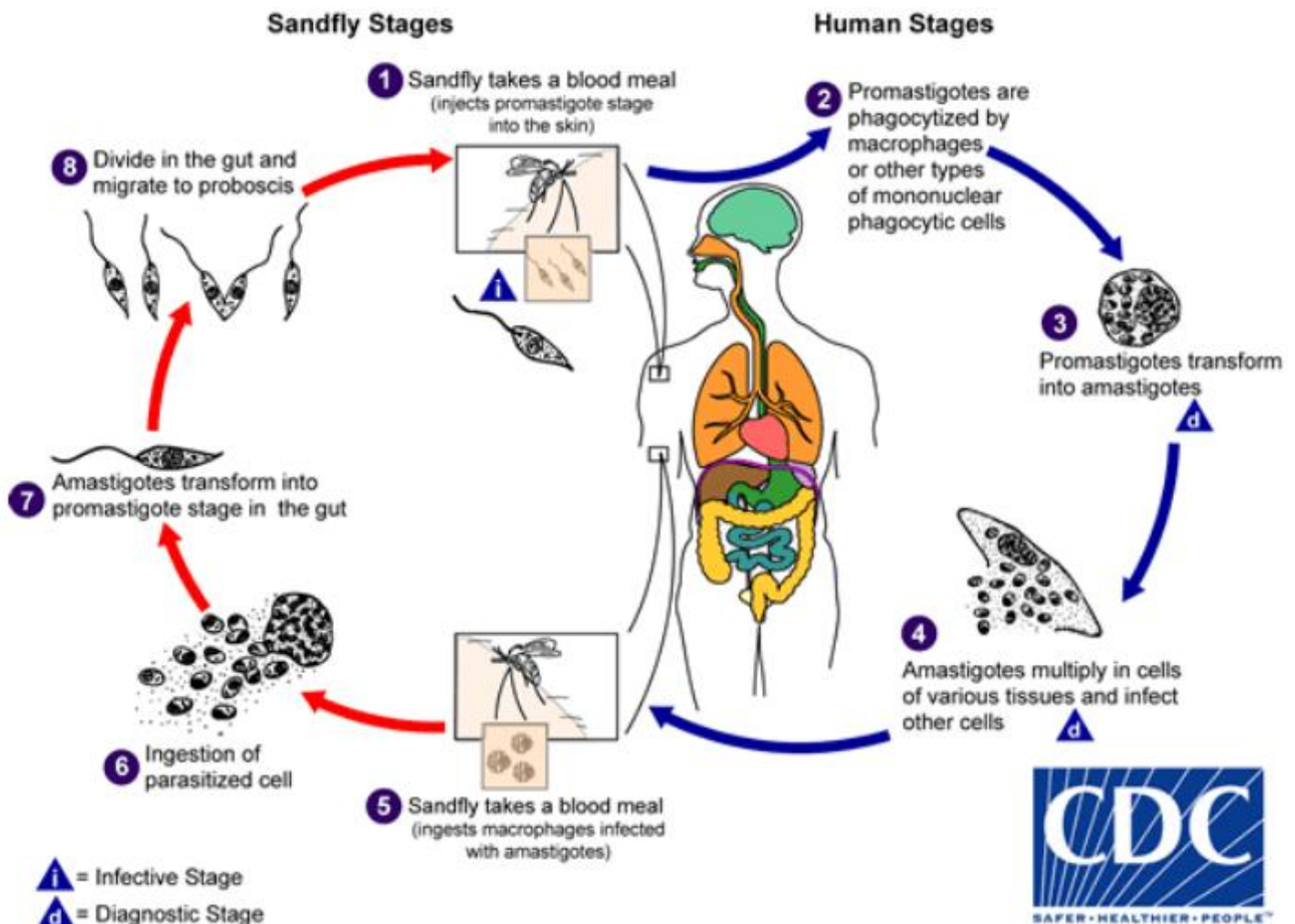


Figura 5. Ciclo de Vida de *Leishmania*

Fuente: (Center for Disease Control and Prevention, 2015).

1.1.3 Huéspedes reservorios

La *Leishmania* dependiendo de su huésped reservorio, se la clasifica en dos categorías: zoonóticas, donde los animales salvajes o domésticos son huéspedes reservorios del parásito y antroponóticas, en la que el huésped reservorio es el ser humano. Sin embargo existen excepciones (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Las principales características de un huésped reservorio; la infección al animal no debe ser altamente patógena para que los parásitos sobreviva dentro de este, además los parásitos deben encontrarse en grandes cantidades en piel y en sangre para que pueden pasar al

flebótomo cuando este se alimenta, y de esta forma continuar con el ciclo de vida de *Leishmania* (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Se conoce que los huéspedes reservorios, son principalmente animales salvajes, entre los cuales encontramos, canidos no domésticos, roedores, entre otros, sin embargo se sigue estudiando la función de estos animales como huéspedes reservorios. En sur América, los animales identificados como huéspedes reservorios son: perezosos, osos hormigueros y zarigüeyas, reservorios principalmente de *L. guyanensis*, se considera que estos animales podría ser responsable de la dispersión del parásito en esta región (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Actualmente se conoce que el perro domestico es el principal huésped reservorio de *L. infantum* tanto el viejo mundo, como en el nuevo mundo, además se lo relaciona con la transmisión del parásito a seres humanos a través de los flebótomos (Cabral , et al., 1998).

1.1.4 Manifestaciones clínicas de leishmaniasis

El parásito produce diferentes formas clínicas que son: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis en mucosa o mucocutánea y leishmaniasis visceral, cada una se diferencia por la especie de *Leishmania* que infecte al huésped vertebrado (Organización Mundial de la Salud, 2010).

1.1.4.1 Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea localizada se evidencia solo en la piel, se presenta después de haber sido picado por un flebótomo, las lesiones iniciales en la piel son pápulas, sin embargo se puede presentar un sin número de lesiones como: úlceras, nódulos lisos y lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas; en algunos casos los parásitos viajan a través los vasos linfáticos llegando a producir lesiones secundarias en la piel (The Center for Food Security Public Health, 2010).

Este tipo de lesiones generalmente es indolora siempre y cuando no existan lesiones secundarias, la mayoría de estas lesiones se curan rápidamente y la velocidad de la

cicatrización depende de la especie de *Leishmania*, el tiempo promedio de incubación del parásito es de 1 a 2 semanas y puede llegar a durar varios meses inclusive años (The Center for Food Security Public Health, 2010).

La leishmaniasis cutánea localizada, en el viejo mundo (África, Europa, Asia) es causada principalmente por cinco especies del subgénero *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. donovani*, mientras que el nuevo mundo (continente Americano) es causada por el subgénero *viannia*, dentro de la cual encontramos a *L. mexicana*, las lesiones causadas por esta suelen curarse espontáneamente de 3 a 4 meses, mientras que las causadas por las especies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* también del subgénero *viannia*, pueden curarse sin tratamiento pasados los 6 meses (Organización Mundial de la Salud, 2010).

La leishmaniasis cutánea difusa es otra forma de leishmaniasis cutánea, presenta lesiones no ulcerativas diseminadas por todo el cuerpo, esta forma de leishmaniasis se caracteriza por la falta de respuesta inmunitaria del huésped frente a antígenos del parásito, este tipo de leishmaniasis no se cura espontáneamente. En el viejo mundo (Europa, Asia, África) la leishmaniasis cutánea difusa es causada por *L. ethiopica*, y en el nuevo mundo (América) es causado únicamente por *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Organización Mundial de la Salud, 2010).

1.1.4.2 Leishmaniasis en mucosa

La leishmaniasis en mucosa o mucocutánea se encuentra principalmente en Latinoamérica, se manifiesta de 1 a 5 años después de haber contraído leishmaniasis cutánea, los signos iniciales son enrojecimiento de la piel (eritema) y ulceraciones en los orificios nasales, que puede extenderse hasta el septo nasal, faringe, laringe y si no se tiene los debidos cuidados puede llegar a desfigurar el rostro, esta forma de leishmaniasis no se cura de forma espontánea (The Center for Food Security Public Health, 2010).

La leishmaniasis en mucosa en el viejo mundo no es muy común, el número de casos es muy bajo sin embargo, las personas con formas menores de inmunodepresión pueden presentar lesiones en la mucosa bucal o laríngea es causada por: *L. infantum*, *L. major* o *L. trópica*. En el nuevo mundo es causada por las especies *L. braziliensis* y *L. panamensis*, la

mayoría de los casos se registran en Bolivia, Brasil y Perú (Organización Mundial de la Salud, 2010).

1.1.4.3 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral también conocida como kala-azar consiste en la infección de órganos viscerales debido a un fallo del sistema inmunitario (Kaye, et al., 2004), este tipo de infección puede llegar a ser mortal para quien la padece (The Center for Food Security Public Health, 2010), afecta a órganos como : bazo , hígado , mucosa del intestino delgado, medula ósea , ganglios linfáticos; por lo general cuando se contrae este tipo de *Leishmania* estos órganos se encuentran fuertemente parasitados (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Los síntomas comunes de leishmaniasis visceral son: fiebre ondulante prolongada, disminución del apetito, pérdida de peso, signos de anemia y distensión abdominal causado por esplenomegalia y hepatomegalia, también se puede producir trombocitopenia y leucopenia por lo cual el individuo es susceptible a otras infecciones , los síntomas pueden aparecer en un periodo de 10 días a varios años en la mayoría de los casos se hace evidente de 2 a 6 meses después de haber sido picado por el flebótomo(The Center for Food Security Public Health, 2010).

Este tipo de leishmaniasis tiene un alto grado de mortalidad principalmente en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán, se estima que alrededor del mundo unas 50.000 personas mueren al año a causa de esta enfermedad (Chappuis, et al., 2007).

Leishmaniasis visceral puede ser endémica, esporádica o epidémica, en el viejo mundo es causada por las especies, *L. donovani* y *L. infantum*, también se ha descrito algunos casos por *L. tropica*. En zonas donde es endémica la leishmaniasis visceral afecta principalmente a niños menores de 10 años sin embargo el grupo de edad más afectado es de 1 a 4 años principalmente en el Sur de Europa, el norte de África, Asia occidental y central (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En la figura 6 se puede observar las diferentes formas clínicas producidas por *Leishmania* en la imagen 6.A) se puede observar un paciente infectado con leishmaniasis visceral presenta hepatoesplenomegalia, 6.B) leishmaniasis cutánea difusa ,6.C) lesión

ulcerosa de una paciente con Leishmaniasis cutánea, 6.D) reaparecimiento de leishmaniasis cutánea, 6.E) paciente con leishmaniasis cutánea difusa y F) desfiguraciones causadas por leishmaniasis mucocutánea.



Figura 6. Diferentes manifestaciones clínicas producidas por *Leishmania*.

Fuente: (Carrión Herrero, 2007)

1.1.5 Métodos de detección de la enfermedad

Los técnicas desarrolladas para la detección de leishmaniasis se basan en métodos de aislamiento e inmunológicos. Los métodos de aislamiento se los utiliza cuando se presumen que el individuo puede estar afectado con leishmaniasis cutánea o mucocutánea y puede diagnosticarse mediante observación directa de los parásitos. Se toma una muestra biológica del sitio afectado, generalmente la muestra se toma del reborde indurado, no del fondo de la

úlceras debido a que suele estar infectado secundariamente y es difícil la visualización de los parásitos (Alvar , 2001).

La tinción del parásito con coloración Giemsa, permite observar amastigotes intracelulares o dispersos en el campo al haberse roto los macrófagos, sin embargo esta técnica de microscopia no siempre muestran los resultados correctos, debido a que suelen haber pocos parásitos en las lesiones (Alvar , 2001).

Los cultivos de parásito se suele realizar a partir del inóculo de la biopsia y son utilizados principalmente para determinar la especie aunque, también suelen ser usados para realizar pruebas de susceptibilidad a medicamentos, estudios epidemiológicos o fines diagnósticos cuando exista una sospecha y no se haya logrado detectar la enfermedad por otros métodos (Alvar , 2001)

Los medios de cultivo utilizados son axénicos es decir cultivos que contengan solo un tipo de microorganismo, también se utilizan cultivos mono-o bifásicos. Asimismo se suele inocular a animales de experimentación, tiempo después se sacrifica al animal de esta forma, se puede aislar los parásitos que se encuentren en los órganos del animal como es el caso de leishmaniasis visceral (Alvar , 2001).

No obstante el avance y progreso de técnicas moleculares han permitido el desarrollo de diferentes métodos diagnósticos como: ELISAS, la hibridación con sondas de ADN la amplificación de material genético mediante PCR, western blot entre otros. (Alvar , 2001).

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica desarrollada para la amplificación de ADN, ha sido utilizada para la detección de ADN del parásito en biopsias incluso en presencia de ADN del hospedador, también ha sido utilizada para la identificación taxonómica del parásito, asimismo el uso de esta técnica ha permitido identificar casos de infecciones mixtas pues se ha encontrado casos de infección con *L. major/L. donovani* y *L. donovani /L. aethiopica* en muestras localizadas en Sudán (Alvar , 2001).

Además la PCR puede llegar a amplificar hasta 10 fentogramos de ADN que tiene un equivalente a 0,1–0,01 parásito lo que hace que esta técnica sea muy sensible, igualmente se conoce que en enfermos coinfectados por *L. infantum* y VIH la PCR es más sensible que el diagnostico por métodos parasitológicos (Alvar , 2001).

Las técnicas de inmunodiagnóstico, se basan en la detección de células que se generan durante la infección con *Leishmania*, en el caso de leishmaniasis cutánea, la respuesta celular y en la leishmaniasis visceral, la respuesta humoral. La técnica conocida como intradermorreacción de Montenegro, revela la hipersensibilidad celular propia de las leishmaniasis cutáneas y mucocutánea, se la utiliza en estudios epidemiológicos para determinar el porcentaje de la población que ha tenido contacto con el parásito (Alvar , 2001).

Las técnicas serológicas se basan en la detección de anticuerpos y se la utiliza principalmente para determinar si existe infección con leishmaniasis visceral o mucocutánea. En estudios de infecciones con *L. donovani* y *L. infantum* se generan anticuerpos IgG y estas pueden ser detectadas rápidamente en técnicas serológicas cuantitativas o cualitativas sin embargo existe riesgo de presentar reacciones cruzadas con enfermedades relacionadas como *Trypanosoma cruzi* (Alvar , 2001).

ELISA(ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) esta técnica utiliza como antígenos extractos crudos de promastigotes o promastigotes completos y como segundo anticuerpo se utiliza anticuerpo anti-IgG humana conjugada con peroxidasa , obteniéndose así una reacción de color que se puede observar a simple vista o cuantificar utilizando un espectrofotómetro , esta técnica es altamente sensible y específica .Una de sus ventajas es que se puede procesar muchos sueros a la vez y como desventaja la inestabilidad de las enzimas (Alvar , 2001).

Las técnicas de aglutinación son utilizadas como análisis rápido cuando se quiere detectar la enfermedad en lugares rurales, la técnica consiste en una aglutinación en látex se conoce que el método es altamente sensible pero sufre de especificidad, otra técnica rápida es la inmunocromatografía, similar a una prueba de embarazo, se utiliza antígenos recombinantes de anticuerpos anti-*Leishmania* (Alvar , 2001).

En la tabla 1 y 2 se esquematiza las técnicas utilizadas actualmente para la detección de leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral.

Tabla 1. Métodos diagnósticos para detectar Leishmaniasis Cutánea

Leishmaniasis Cutánea	
Aislamiento	
Directos	<ul style="list-style-type: none"> └ Tinción : inmunoperoxidasa, anticuerpos monoclonales └ Cultivo └ Animales de experimentación
Indirectos (detección del genoma)	<ul style="list-style-type: none"> └ Hibridación en nitrocelulosa con sondas de ADN └ PCR
Inmunodiagnóstico	
	<ul style="list-style-type: none"> └ Intradermorreacción de Montenegro

Fuente: (Alvar , 2001)

Tabla 2. Métodos diagnósticos de Leishmaniasis visceral

Leishmaniasis Visceral	
Aislamiento	
Directos	<ul style="list-style-type: none"> └ Tinción : Giemsa, inmunoperoxidasa, anticuerpos monoclonales └ Cultivo └ Animales de experimentación
Indirectos (detección del genoma)	<ul style="list-style-type: none"> └ Hibridación en nitrocelulosa con sondas de ADN └ PCR
Inmunodiagnóstico	
	<ul style="list-style-type: none"> └ Inmunofluorescencia indirecta └ ELISA; ELISA con antígenos recombinantes └ Contrainmunolectroforesis └ Western blot └ Técnicas de aglutinación (hemaglutinación indirecta, aglutinación en látex y aglutinación directa o DAT)

Fuente: (Alvar , 2001)

1.1.6 Respuesta inmunitaria del huésped

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

dendríticas. Los primeros eventos huésped-parásito comienzan, después de la infección con *Leishmania* en la piel. Un proceso inflamatorio local inicia por lo cual comienza la acumulación de leucocitos en este sitio (Texeira, Romero Texeria, Bezerril Andrade , Barral-Netto, & Barral, 2006).

También se conoce que la saliva del flebótomo tiene efectos anticoagulantes y quimioatrayentes de células inmunitarias, incita el reclutamiento de células Polimorfas nucleares (PMN) entre las cuales tenemos eosinófilos, basófilos, neutrófilos, macrófagos (Lima, et al., 1998).

La primera respuesta del huésped vertebrado, es el sistema de complemento las proteínas séricas del complemento tienen como objetivo la lisis del parásito mediante la formación de poros en su membrana, sin embargo los parásitos han desarrollado mecanismos que evitan que sean destruidos (González García, 2003).

Los parásitos después de unirse a la superficie del macrófago son fagocitados, ya en el interior de los macrófagos, las vacuolas se unen a lisosomas formándose fagolisomas que acidifican el medio y vierten enzimas proteolíticas que matan al parásito (Alexander, Satoskar, & Russell, 1999). Otro de los mecanismos de defensa de los macrófago es la producción de peróxido de hidrogeno ($H_2 O_2$) y radicales hidroxilo (OH) también actúa la enzima óxido-nítrico sintasa que sintetiza óxido nítrico mecanismos destinados a la destrucción del parásito (Hall & Titus, 1995).

Cuando los parásitos son opsonizados por el factor del complemento C3b, son reconocidos por el receptor C1 de los macrófagos sin embargo la proteína gp63 presente en la membrana del parásito acelera la conversión de C3b a su forma inactiva C3bi facilitando la invasión silenciosa al macrófago a través del receptor C3 (Gordon, 2002; Muzio, et al., 2000).

Otros receptores de entrada en los macrófagos son los toll like receptors TLR del macrófago, el CR4, el receptor Fc, el receptor de fibronectina, que también facilitan la entrada a las células epidérmicas de Langerhans. Finalmente, los parásitos y las partícula son opsonizadas y fagocitadas por estas células (Gordon, 2002; Muzio, et al., 2000) además de granulocitos y macrófagos los parásitos de *Leishmania* también infectan células dendríticas (Scott & Hunter, 2002).

Dependiendo de la especie de *Leishmania* implicada, los neutrófilos pueden servir como células hospedadoras donde sobreviven los parásitos como es el caso de *L. major* que vive en estas células durante los primeros días de infección (Laufs, et al., 2002) o puede actuar como células fagocíticas leishmanicidas durante la fase temprana de la infección como sucede con *L. infantum* (Rousseau, et al., 2001).

Uno de los mecanismos que permiten a *Leishmania* evitar de forma exitosa las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas del hospedador es la producción de una serie de proteínas que los promastigotes metacíclicos expresan en su superficie estas son: lipofosfoglicano LPG, glucoproteína gp63 y proteínas kinasas leishmaniales que inhiben la lisis mediada por el complemento, así también las proteínas LPG y gp63 inducen la fagocitosis del parásito (Alexander, Satoskar, & Russell, 1999).

Por otro lado, los parásitos que son destruidos por los macrófagos, liberan proteínas antigénicas que son procesadas. Los péptidos resultantes, se asocian a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad CMH, los macrófagos y las células presentadoras de antígenos APC exponen en su superficie presentan los antígenos a las células T (Alexander & Bryson , 2005).

La interacción de macrófagos y células T activara en estas la diferenciación a Th1 , induciendo la respuesta inflamatoria y citotóxica CD8+ el objetivo de las Th1 es la producción de citocinas como el interferón gama IFN - γ , interleucina 12 IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa TNF - α que ayuda a la eliminación del parásito (Alexander, Satoskar, & Russell, 1999).

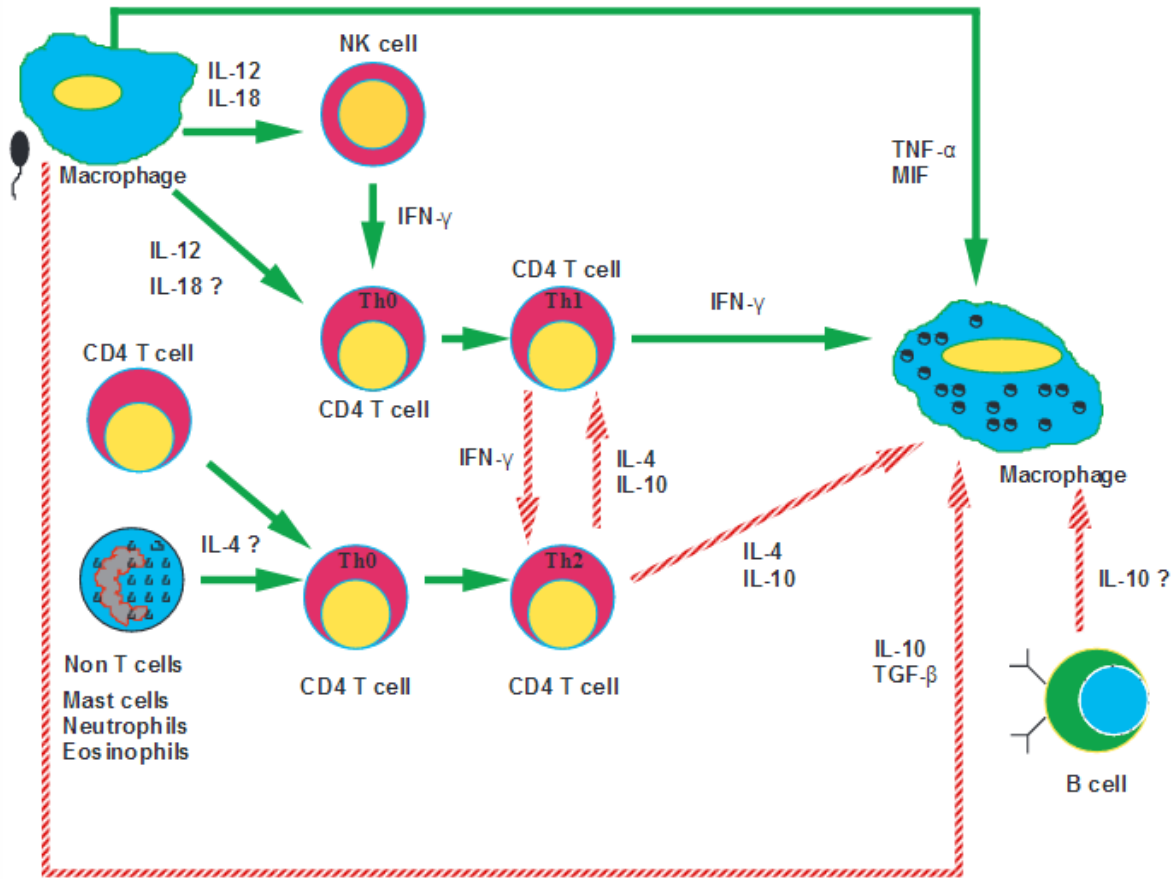


Figura 7. Células y citoquinas involucradas en la respuesta inmune, la flecha verde indica una regulación positiva, roja regulación negativa

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

Las células dendríticas también juegan un papel esencial como células presentadoras de antígenos APC ya que son un nexo entre la respuesta inmunitaria innata y la adquirida (Banchereau, et al., 2000). Durante el contacto con *Leishmania* las células dendríticas inmaduras interactúan a través de sus receptores con diversos antígenos leishmaniales que son reconocidos a través de patrones moleculares patogénicos PAMP (Colmenares, Corbí, Turco, & Rivas, 2004)

Después de la interacción entre los parásitos y las células dendríticas, éstas sufren un proceso de maduración durante el cual aumentan la expresión en superficie del complejo mayor de histocompatibilidad MHC de tipo I y II, así como moléculas coestimuladoras (CD40, CD54, CD80 y CD86) que ayudan a la unión de células T y APC. Por otro lado las células dendríticas

infectadas sintetizan interleucina IL-12 que conduce a la generación de células Th1 (Von Stebut, et al.,2003; Scott & Hunter, 2002)

Además las células dendríticas transportan antígenos de los parásitos hacia los ganglios linfáticos y hacia el bazo, donde interactúan con ligandos de los linfocitos T, de esta forma se produce la activación de células T mediante las interacciones CD40-CD40L y CD80/86-CD28, mientras que la interacción CD80/86-CTLA-4 no produce la activación. Dependiendo del tipo de interacción que se establezcan se produce diferentes tipos de respuestas como la generación de células Th1/Th2 (TCD4+), células citotóxicas (TCD8+) o supresor T reguladoras (Antoine, Prine, Courret, & Lang, 2004)

La activación de las células Th1 conllevan a la superación de la infección esta respuesta previene el crecimiento del parásito y desarrollo de lesiones (Baratta-Masini, et al., 2007) además se ha comprobado que las células CD4+ productoras de IFN- γ son esenciales para curar lesiones producidas por la leishmaniasis cutánea (Texeira, Romero Texeria, Bezerril Andrade , Barral-Netto, & Barral, 2006)

La Respuesta inmunitaria de tipo Th2 producen las citocinas IL-10 e IL-4 y factor de crecimiento transformante TGF- β , esta respuesta facilita la invasión del parásito (Sacks & Anderson, 2004) promueven un fenotipo de susceptibilidad en el hospedador (Alexander & Bryson , 2005).

Investigaciones recientes de infecciones experimentales en ratones con *L. major* demuestran que los parásitos inducen la acumulación de Las células T reguladoras exclusivamente en sitios de infección, producen interleucina10 IL-10 una citosina que no inhibe la acción leishmaniacida de las células por lo tanto, estas células favorecen la persistencia parasitaria, aunque también mantiene la memoria inmunológica en ratones resistentes (Von Stebut, et al., 2003).

1.1.7 Proteínas del parásito

El parásito *Leishmania* presenta una gran variedad de moléculas que le permiten infectar a las células del huésped vertebrado y también ha desarrollado varias estrategias de defensa, que le permiten evadir las respuestas innatas y adquiridas del hospedador gracias una

serie de proteínas en la superficie de su membrana como las LPG, gp63, cisteína proteasas (Cunningham, 2002).

Lipofosfoglicano LPG, se encuentra en abundancia en el flagelo debido a que ayuda al anclaje del parásito en los microvili intestinales del insecto, mientras que en el vertebrado fija la fracción C3b para promover la opsonización y reconocimiento de receptores CR1, CR3 del macrófago y favorece el ingreso al macrófago anclándose a la membrana celular con la ayuda de la glicosilfosfatidinositol GPI (Cunningham, 2002).

Metaloproteasa gp 63, es una glicoproteína de superficie con actividad proteasa, se localiza en la superficie de del parásito esta se une a la membrana de los macrófagos mediante la GPI (glicosilfosfatidinositol) se encuentra en la fase de amastigotes y promastigotes. Además esta proteína está muy conservada en la mayoría de las especies de leishmaniasis pues entre especies existe un 70 % de homología en su secuencia aminoacídica. La producción de esta proteína es diferente en cada especie de *Leishmania* debido a diferentes genes y al control post-transcripcional. Diferentes investigaciones señalan que esta proteína protegen al promastigote del pH ácido y enzimas líticas (Cunningham, 2002)

Glicoproteina 63 kDa, proteína abundante en la superficie del promastigote, protege al parásito de las enzimas proteolítica del flebótomo, el ingreso del parásito al macrófago del hospedador es a través del receptor C3 (Niederwieser, 2004; Martinez Salazar Berzunza-Cruz, & Becker, 2008).

La Proteína homóloga a los receptores de Kinasa C activa LACK (*Leishmania* activated C kinase), esta proteína ayuda a la adaptación del parásito a distintos ambientes y es importante en la virulencia del parásito (Sacks & Trauth, 2002).

Las proteínas de Choque térmico (HSP) tenemos: HSP60, HSP70 y HSP 83 son proteínas sintetizadas por el parásito durante estrés térmico se interrumpe su síntesis a partir de 42 °C. El choque térmico no es el único mecanismo que provoca la expresión proteica de las HSP, también pueden influir la fagocitosis del parásito en el macrófago (Alvar , 2001;Sacks & Trauth, 2002).

1.1.8 Leishmaniasis en América Latina

En las Américas la leishmaniasis se ha convertido en un problema de salud pública debido a su magnitud y distribución geográfica. El mayor número de casos se han reportado en zonas con vegetación tipo tropical o subtropical densa, humedad, templada y seca (Organización Panamericana de la salud , 2005).

En las Américas el parásito es transmitido por las moscas del género *Lutzomyia*, existen alrededor de 400 especies identificadas sin embargo existen 50 especies relacionadas con el parásito *Leishmania* (Pan American Health Organization, 2013), además se conoce que la especie *Lutzomyia longipalpis*, es un importante vector de transmisión del parásito en Latinoamérica (Gramiccia & Gradoni, 2005). La leishmaniasis en el continente Americano es causada principalmente por 5 especies *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. donovani* (Organización Mundial de la Salud, 2010).

La leishmaniasis cutánea y mucosa son endémicas en 18 países de América Latina desde México hasta Argentina también se conoce que la leishmaniasis visceral es autóctona en 12 países de la región siendo Brasil, Paraguay, Colombia, Argentina, México, Honduras, El Salvador y Guatemala los más afectados (Organización Panamericana de la salud , 2005).

En el 2011 en las Américas se reportaron 57.278 casos de leishmaniasis (tabla 1), 95.7% de los casos corresponden a leishmaniasis cutánea y un 4.3% a leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Pan American Health Organization, 2013).

Tabla 3. Casos de leishmaniasis Cutánea y mucosa en las Américas (2001-2011)

Sub-region/ Countries	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Americas	47.286	56.243	61.518	59.439	67.949	62.017	59.027	52.324	57.265	58.347	57.287
México	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	468
Andean Area	13.165	17.841	19.864	22.860	30.697	29.177	27.852	20.562	24.886	25.868	25.040
Bolivia	2.043	2.518	2.452	2.819	2.657	3.152	3.153	1.838	1.218	1.809	1.636
Colombia	4.130	7.038	9.267	10.698	18.043	16.241	13.331	9.595	15.420	14.818	9.684
Ecuador	1.754	1.253	1.336	2.494	1.925	1.536	1.185	1.479	1.735	1.629	965
Peru	5.238	7.032	6.809	6.849	8.072	8.248	10.183	7.650	6.513	7.612	11.204
Venezuela	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.551
Central America	7.186	8.135	9.336	6.744	9.687	9.717	8.903	11.037	9.959	9.637	10.134
Costa Rica	425	690	948	1.061	1.676	1.870	1.807	818	2.025	1.143	1.376
El Salvador	18	46	24	76	24	46	36	31	-	4	17
Guatemala	-	1.549	1.143	870	1.243	602	287	494	519	410	549
Honduras	957	1.260	1.684	797	1.574	1.300	855	1.759	1.502	1.362	1.736
Nicaragua	2.924	2.200	3.716	2.103	3.521	2.125	3.719	5.826	4.047	3.497	3.235
Panama	2.862	2.390	1.821	1.837	1.649	3.774	2.199	2.109	1.866	3.221	3.221
Brazil	26.328	28.268	30.812	28.737	26.685	22.397	21.530	20.123	21.989	22.397	21.306
Southern Cone	607	1.999	1.496	1.089	873	720	736	588	422	430	324
Argentina	157	748	348	358	282	257	201	208	163	166	140
Paraguay	450	1.251	1.148	731	591	463	535	380	259	264	184
No-Latin Caribbean	-	-	10	9	7	6	6	14	9	15	15
Guyana	-	-	10	9	7	6	6	14	9	15	15

Fuente: (Pan American Health Organization, 2013)

En las Américas, la transmisión de la leishmaniasis cutánea y mucosa se produce principalmente en áreas selváticas, y afecta principalmente a personas de bajos recursos y con mayor dificultad de acceso a los servicios de salud (Organización Panamericana de la Salud, 2013).

La infección con *Leishmania* se produce cuando el ser humano ingresa al hábitat del vector biológico (flebotomos); las razones principales son las actividades laborales y el turismo, sin embargo en los últimos años se ha reportado casos de transmisión peri-domicilio e intra-domicilio debido a que los flebotomos se han adaptado a estos ambientes (Organización Panamericana de la Salud, 2015).

Actualmente en las Américas cada año se reportan alrededor 60.000 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa y 4.000 casos de leishmaniasis Visceral con una tasa de mortalidad del 7%, también se conoce que alrededor del mundo el 75 % de los casos de leishmaniasis cutánea se encuentra en las Américas siendo Brasil, Colombia, Perú y Nicaragua

los más afectados por esta enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2014). En la Figura 8 se puede observar la distribución de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en las Américas.

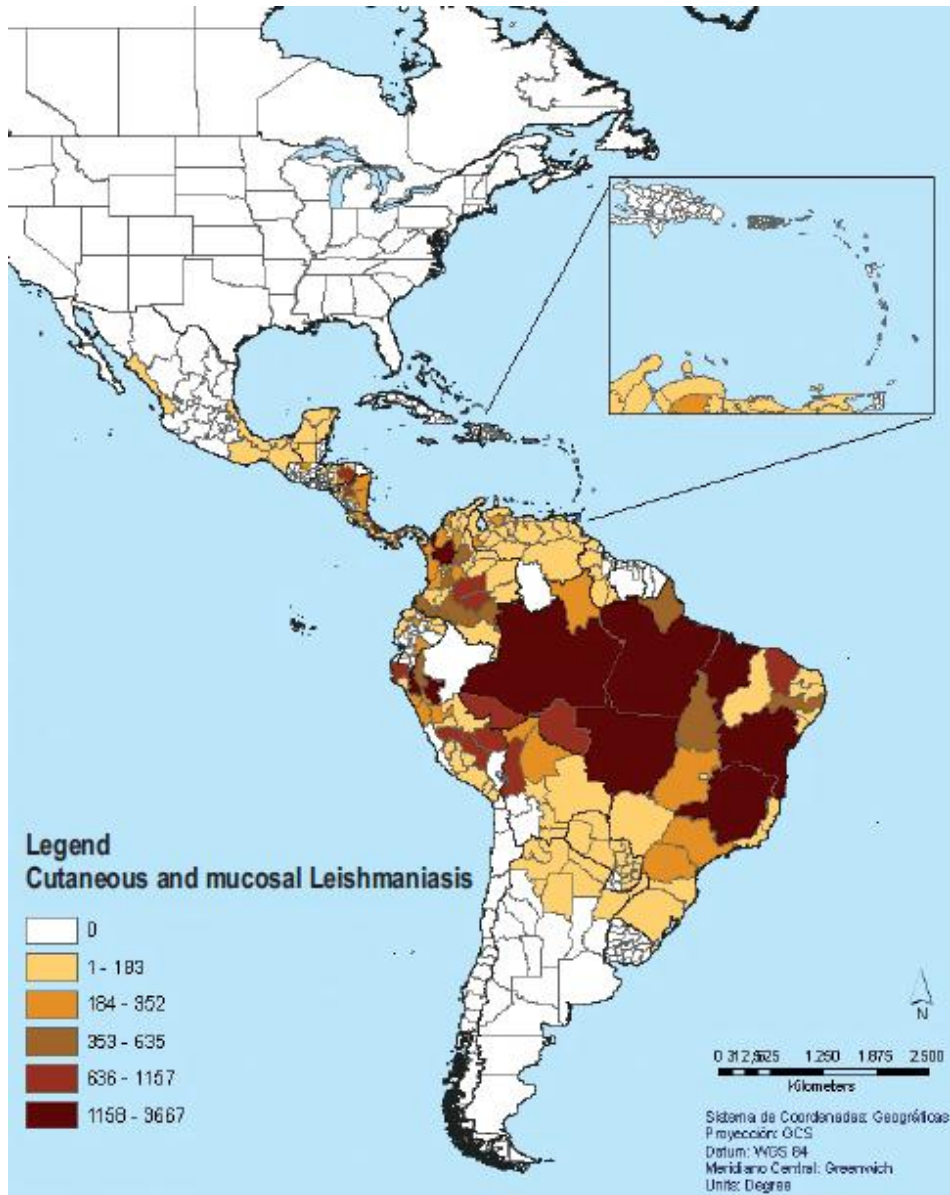


Figura 8. Distribución de leishmaniasis cutánea y mucosa en las Américas en el año 2011.

Fuente: (Pan American Health Organization, 2013)

1.1.9 Leishmaniasis en Ecuador

En el Ecuador el primer caso de leishmaniasis se notificó en una mujer en 1920 por Valenzuela a partir de esta fecha se notificaron diferentes casos clínicos en seres humanos atribuidos a esta enfermedad, sin embargo investigaciones acerca de cómo se da la transmisión de la leishmaniasis, vectores biológicos y reservorios no se realizaron hasta 1980 (Hashiguchi & Gómez Landires, 1990)

En el Ecuador como en otros países Sur Americanos *Leishmania* es endémica en zonas tropicales y subtropicales, hasta 1990 la leishmaniasis endémica se encontraba en las provincias de Pichincha ,Napo , Pastaza , Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Loja, El Oro, Azuay, Cañar, Bolívar, Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeraldas (Hashiguchi & Gómez Landires, 1990).

Actualmente *Leishmania* se encuentra en 23 de las 24 provincias del Ecuador y afecta principalmente a personas de bajos recursos que habitan en sectores rurales, se puede encontrar casos a partir de los 300 msnm hasta la Sierra en valles interandinos con altitudes entre 1.200 a 2.400 msnm, zonas donde se encuentran bosques tropicales y subtropicales que son nichos ecológicos del vector biológico así como de los huéspedes reservorios (SNEM, 2013).

De acuerdo con diferentes investigaciones la especie *L. braziliensis* se encuentra en la región amazónica mientras que *L. mexicana* se encuentra en la región Inter-Andina (Calvopina, et al., 2006). También es probable que la leishmaniasis exista en forma de zoonosis en la selva húmeda tropical y subtropical del Ecuador, diferentes investigaciones indican que los vectores biológicos implicados en la transmisión del parásito en el Ecuador son *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni* (Hashiguchi & Gómez Landires, 1990).

Además se encontró cinco animales salvajes con infección natural por *Leishmania* y son: *Choloepsh didactylus*, *Sciurus granatenis*, *Sciurus vulgaris*, *Potos flavus* y *Tammdua tetradactya*. (Hashiguchi & Gómez Landires, 1990).De acuerdo con Calvopina (2004) en el Ecuador los perros podrían ser huéspedes reservorios de *Leishmania* debido a que se encontró una alta reactividad en sueros de perros utilizando la técnica ELISA.

Como se puede observar en la Tabla 4 en el Ecuador podemos encontrar seis tipos de especies de *Leishmania*.

Tabla 4 . Especies de *Leishmania* presentes en el Ecuador

Subgénero	Subespecie	Formas clínicas
<i>L. viannia</i>	<i>braziliensis</i>	Leishmaniasis Cutánea Leishmaniasis mucosa
	<i>guyanensis</i>	Leishmaniasis Cutánea
	<i>panamensis</i>	Leishmaniasis Cutánea Leishmaniasis mucosa
<i>L. leishmania</i>	<i>mexicana</i>	Leishmaniasis Cutánea
	<i>amazonensis</i>	Leishmaniasis Cutánea
	<i>major-like</i>	Leishmaniasis Cutánea

Fuente: (Kato, et al., 2005) (Armijos, et al., 1997)

Elaborado: (Ramos, 2016)

En el Ecuador el Ministerio de Salud desde el año 2013, lleva un control semanal en las 24 provincias del Ecuador de diferentes enfermedades con alto potencial epidémico entre las cuales encontramos leishmaniasis cutánea, Varicela, Tétanos, Hepatitis B entre otras (Ministerio de Salud Pública Ecuador, 2015)

De acuerdo con la gaceta epidemiológica semanal número 53 del año 2015, (Figura 9) se puede observar un incremento de casos de leishmaniasis cutánea entre las semanas 11 y 13, 45 y 47 que corresponderían a los meses de marzo–abril , octubre-noviembre , lo cual indicaría que entre estos meses los vectores biológicos son más activos .

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES LEISHMANIASIS CUTÁNEA CIE - 10 B 55.1 Ecuador, SE 1- 53, 2015

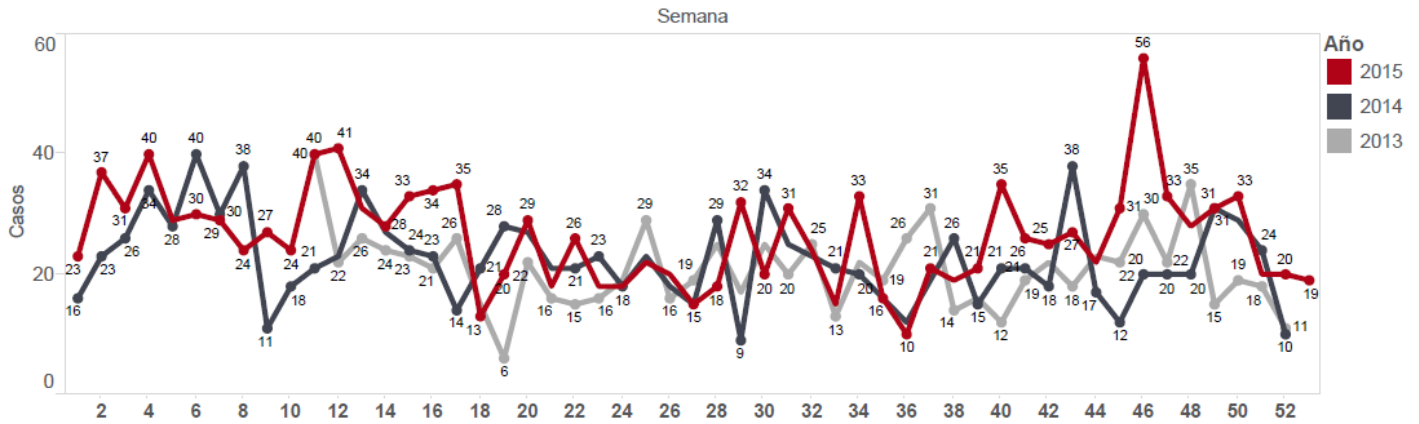


Figura 9. Casos de Leishmaniasis en Ecuador año (2013-2015)

Fuente: (Ministerio de Salud Pública Ecuador, 2015)

En la Figura 10 se puede observar el número de casos de leishmaniasis reportados en el año (2015) por provincias.

Número de casos de Leishmaniasis, por provincias y semana epidemiológica.

Provincia	Semana (grupo)		Total gene..
	SE 1 - 52	53	
PICHINCHA	332		332
SANTO DOMINGO DE LOS ..	207	7	214
ESMERALDAS	205	3	208
MORONA SANTIAGO	98	1	99
ORELLANA	94	2	96
PASTAZA	66		66
SUCUMBIOS	62		62
BOLIVAR	54		54
MANABI	49	3	52
NAPO	44	2	46
IMBABURA	39		39
EL ORO	34		34
GUAYAS	29		29
CHIMBORAZO	16		16
LOS RIOS	12		12
ZAMORA CHINCHIPE	11		11
COTOPAXI	7	1	8
LOJA	6		6
AZUAY	5		5
CARCHI	4		4
TUNGURAHUA	4		4
CAÑAR	2		2
SANTA ELENA	2		2
Total general	1.382	19	1.401

Número de casos de Leishmaniasis, por provincia.

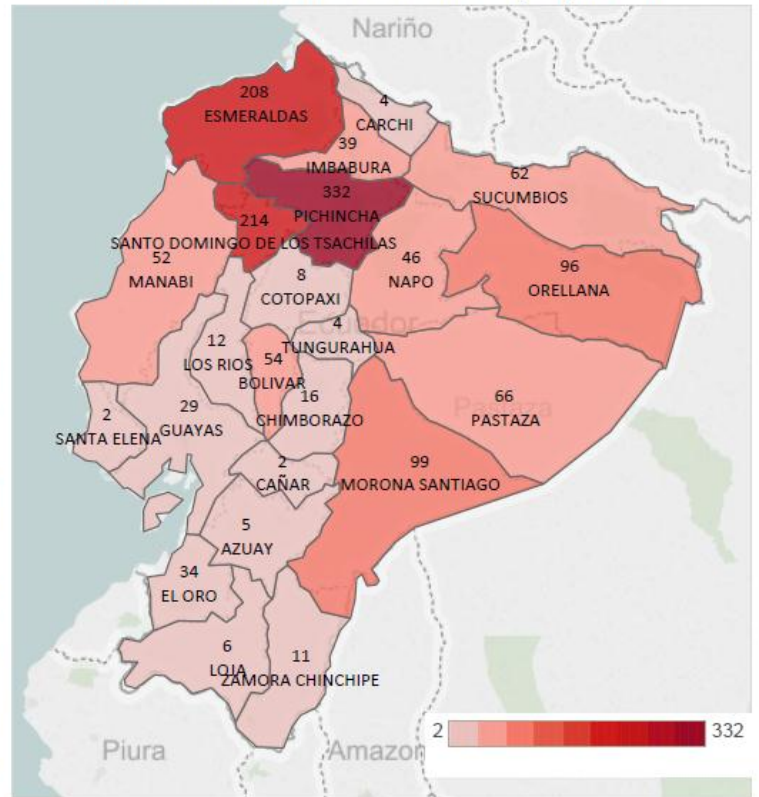


Figura 10. Número de Casos de *Leishmania* reportado por provincias en el Ecuador.

Fuente: (Ministerio de Salud Pública Ecuador, 2015)

1.2 Antecedentes

Generalmente los animales domésticos o selváticos infectados con *Leishmania* pueden presentar signos de tener la enfermedad; como pocos amastigotes en la piel o vísceras o simplemente no presentan signos de la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Uno de los animales domésticos más afectados y al cual se lo ha propuesto como huésped reservorio de leishmaniasis en Sur América es el perro; en Europa diferentes estudios indican que estos animales son huéspedes reservorios de leishmaniasis visceral, la especie relacionada es *L. infantum* (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En los animales salvajes o domésticos esta enfermedad es generalmente asintomática, en perros el periodo de incubación varía de 3 meses a 7 meses, actualmente los perros son los animales más expuestos a esta enfermedad y pueden llegar a contraerla en cualquier momento (The Center for Food Security Public Health, 2010).

En América latina la costumbre de tener animales cerca de las casas aumentan el riesgo de contraer esta enfermedad, se conoce que los flebótomos son atraídos por los perros ya que son los principales huéspedes de la leishmaniasis cutánea, también se deduce que tener gallineros cerca de las casa representa un riesgo debido a que los animales selváticos son atraídos por estos, y estos son reservorios naturales de *Leishmania* (Organización Mundial de la Salud, 2010).

1.2.10 Leishmaniasis en equinos

Los équidos también llegan a ser afectados por *Leishmania*, entre ellos encontramos: caballos, mulas y burros, estos pueden desarrollar lesiones cutáneas, en la cabeza, orejas, cuello, patas y escroto sin embargo no se ha documentado casos de leishmaniasis visceral en estos animales (The Center for Food Security Public Health, 2010).

En Sur América el primer caso de un caballo infectado con leishmaniasis se reportó en Argentina en el año 1927, la especie relacionada fue *L. braziliensis*. En los últimos años se han reportado infecciones de equinos en Venezuela, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos. Sin embargo no se conoce con exactitud, si estos animales son huéspedes reservorios de *Leishmania* o son huéspedes accidentales de esta (Truppel, et al., 2014); (Vedovello Filho, Jorge, C. Lonardoni, Teodoro, & V. Silveira, 2008).

Las siguientes investigaciones realizadas en equinos aparentemente sanos, que habitan en zonas endémicas de *Leishmania*, revelan que estos animales están siendo infectados con el parásito.

En el sur de Brasil en zonas endémicas donde se encuentra *L. braziliensis*, se investigó si los equinos llegan a ser infectados con el parásito. Se tomaron muestras de sangre de 227 equinos (caballos, burros, mulas), ninguno de los cuales presentaban lesiones cutáneas producidas por *Leishmania*, los sueros fueron sometidos a ensayos de PCR y ELISA (Truppel, et al., 2014).

En los resultados se encontró anticuerpos anti-*Leishmania*, así como ADN del parásito, por lo que se demostró que en zonas endémicas de *Leishmania braziliensis*, los equinos están infectados con el parásito y a su vez estaría relacionado con el alto número de casos de leishmaniasis en seres humanos (Truppel, et al., 2014).

Así mismo en el estado Paraná en Brasil donde *L. braziliensis* también es endémica, se analizaron 55 sueros de caballos de los cuales 42 sueros presentaron anticuerpos anti-*L. braziliensis*, los resultados indican que los animales tuvieron contacto con el parásito, sin embargo no se logró determinar la importancia de los equinos en el ciclo del parásito (Vedovello Filho, Jorge, C. Lonardoni, Teodoro, & V. Silveira, 2008).

En Venezuela en el Estado de Aragua, tres burros *Equus asinus*, dos machos y una hembra, presentaban lesiones cutáneas tipo dermatitis nodular, se tomaron muestras de tejido por biopsia, las muestras fueron analizadas y se comprobó que los equinos estaban infectados con *Leishmania* (Morales B, et al., 2010).

En la figura 11 se puede observar uno de los animales infectados con *Leishmania*. En la imagen 11.A) se observa dermatitis nodular eritematosa ulcerosa a costrosas crónica con centro ulcerado y bordes de reepitelización complicadas, 11.B) cortes histológicos de piel que evidencian dermatitis nodular erosiva ulcerativa costrosa, con abundantes macrófagos reactivos con estructuras subcelulares compatibles con formas de amastigotes de protozoarios tipo flagelados (10X), 11.C) cortes histológicos de piel con coloración especial PAS que evidencian estructuras subcelulares compatibles con formas de amastigotes de protozoarios tipo flagelados (PAS 40X) (Morales B, et al., 2010).

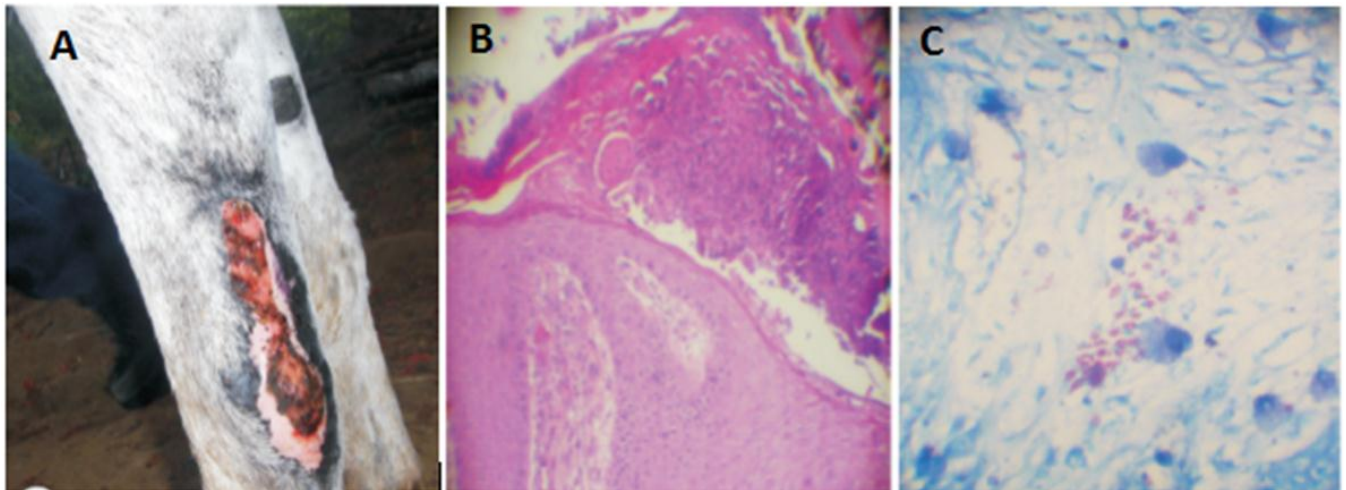


Figura 11. *Equus asinus* infectado con leishmaniasis A) Dermatitis nodular eritematosa, B) Cortes histológicos de piel, C) Cortes histológicos con coloración PAS

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

De la misma forma en la investigación realizada en España por Fernández (2005) a 55 caballos aparentemente sanos, que viven en zonas endémicas de *L. infantum*, se encontró que los estos desarrollan inmunidad específica humoral y celular que generalmente es eficaz en la prevención del desarrollo de la enfermedad en caballos (Fernández-Bellon , et al., 2005).

1.3 Importancia del estudio

La Leishmaniasis cutánea, se puede curar en individuos inmunocompetentes, es decir que el sistema inmunitario se active normalmente, sin embargo para tratar leishmaniasis en

mucosa y visceral se utilizan antimoniales pentavalente como meglumina y el estibogluconato de sodio, siempre y cuando los parásitos sean sensibles a estas drogas. Otras drogas como el alupurinol, anfotericina B o anfotericina liposomal B y miltefosina, se deben administrar vía parenteral, en el caso de leishmaniasis cutánea se puede utilizar drogas tópicas, sistémicas o intralesionales que pueden administrarse directamente en las lesiones, el uso de estos depende de la especie de *Leishmania* (The Center for Food Security Public Health, 2010; Organización mundial de la Salud,2010)

La Organización panamericana de la salud (2013) describe las siguientes recomendaciones para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y mucosa, como se puede observar en la Tabla 5 el esquema terapéutico para el tratamiento de la enfermedad en las Américas.

Tabla 5. Opciones Terapéuticas de leishmaniasis cutánea y mucosa en las Américas presentados según su forma clínica, indicación y nivel de evidencia.

Descripción	Tratamiento	
	Indicaciones terapéuticas	Nivel de atención
Leishmaniasis cutánea localizada ■ lesión única hasta de 900 mm² (diámetro de 3 cm) en cualquier localización, excepto cabeza y regiones periarticulares, ausencia de inmunodepresión y posibilidad de efectuar seguimiento	Tratamiento local¹ (opciones por calidad de la evidencia): ■ Termoterapia. <i>Ver restricción de uso en el cuadro con los esquemas terapéuticos para tratamiento de la leishmaniasis cutánea</i> ■ Antimoniales pentavalentes intralesionales	Centro de referencia.
	Tratamiento sistémico (opciones por calidad de la evidencia): Primera línea ■ Antimoniales pentavalentes ■ Miltefosina ■ Isetionato de pentamidina (<i>L. guyanensis</i> y <i>L. panamensis</i>) ■ Ketoconazole (<i>L. mexicana</i> y <i>L. panamensis</i>) Segunda línea ■ Anfotericina B	Primer o segundo nivel de atención. Segundo nivel o centro de referencia.
Leishmaniasis cutánea localizada ■ Lesión única con más de 900 mm² en cualquier localización o ■ lesión única de cualquier tamaño, en cabeza o regiones periarticulares o ■ lesiones múltiples ■ lesiones únicas previamente tratadas localmente que no respondieron o recayeron	Tratamiento sistémico (opciones por calidad de la evidencia): Primera línea ■ Antimoniales pentavalentes ■ Miltefosina ■ Isetionato de pentamidina (<i>L. panamensis</i> y <i>L. guyanensis</i>) ■ Ketoconazole (<i>L. mexicana</i> y <i>L. panamensis</i>) Segunda línea ■ Isetionato de pentamidina ■ Anfotericina B ■ Anfotericina B liposomal	Primer o segundo nivel de atención. Segundo nivel o centro de referencia.
	Tratamiento sistémico (opciones por calidad de la evidencia): Primera línea ■ Antimoniales pentavalentes Segunda línea ■ Anfotericina B liposomal ■ Anfotericina B	Segundo nivel o centro de referencia.
Leishmaniasis cutánea diseminada	Tratamiento sistémico (opciones por calidad de la evidencia): Primera línea ■ Antimoniales pentavalentes Segunda línea ■ Anfotericina B liposomal ■ Anfotericina B	Segundo nivel o centro de referencia.
Leishmaniasis cutánea difusa	Tratamiento sistémico (opciones por calidad de la evidencia): ■ Antimoniales pentavalentes ■ Anfotericina B liposomal ■ Isetionato de pentamidina ■ Anfotericina B desoxicolato	Centro de referencia.
Leishmaniasis mucosa	Tratamiento sistémico (opciones por calidad de la evidencia): ■ Antimoniales pentavalentes + pentoxifilina ■ Antimoniales pentavalentes ■ Anfotericina B liposomal ■ Isetionato de pentamidina ■ Anfotericina B desoxicolato	Centros de referencia.

Fuente: (Organización Panamericana de la Salud, 2013)

Sin embargo diferentes estudios y hasta el mismo paciente, señalan que el uso de estos medicamentos tiene efectos secundarios como: anorexia, vomito, nauseas, cefaleas, entre los efectos colaterales graves tenemos hepatotoxicidad o cardiotoxicidad (Organización Mundial

de la Salud, 2010). En la Tabla 6 se puede observar los diferentes efectos colaterales causados por el uso de los medicamentos utilizados actualmente para tratar la leishmaniasis.

Tabla 6. Frecuencia de los efectos adversos clínicos, de laboratorio y electrocardiográficos en los pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con antimonios pentavalentes e isetionato de pentamidina

Signos y síntomas	Antimoniales Pentavalentes 10-20 mg/kg/d		Isetionato de Pentamidina 2-4 mg/kg/d	
	Nº	%	Nº	%
Mialgia/artralgia	848	48,6	289	24,9
Trastornos gastrointestinales	361	17,4	312	21,5
Dolor de cabeza	632	23,6	224	15,2
Anorexia	257	19,4	15	46,7
Astenia/fatiga	127	18,9	128	21,1
Fiebre	430	16,7	103	8,7
Reacciones cutáneas	238	5,9	38	5,3
Alteraciones cardiovasculares	254	6,7	77	7,8
Alteraciones respiratorias	76	10,5	40	5
Dolor local	42	64,3	526	31,6
Comezón	23	8,7	-	-
Alteraciones del gusto	154	25,3	40	17,5
Alteraciones neurológicas	103	2,9	281	4,6
Alteraciones del equilibrio	77	5,2	88	22,7
Alteraciones del comportamiento	-	-	38	5,3
↑AST/ALT	268	43,3	-	-
↑Lipasa/amilasa	157	59,9	-	-
Leucopenia	52	7,7	-	-
Trombocitopenia	42	7,1	-	-
Hipoglucemia	-	-	83	2,4
Prolongación del Intervalo QTc	162	16	-	-
Vrd	124	25	-	-
Arritmia	61	3,3	-	-

Fuente: (Organización Panamericana de la Salud, 2013)

Debido a que muchos de los medicamentos utilizados actualmente son tóxicos y pueden tener efectos secundarios importantes sobre los pacientes y considerando que no existen un tratamiento efectivo y seguro contra la leishmaniasis se ha buscado reducir la enfermedad con el desarrollo de vacunas (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En así que diferentes investigación muestran que la vacunación puede prevenir la leishmaniasis (Murray, Berman, Davies, & Saravia, 2005). Actualmente el desarrollo de vacunas se basa en la búsqueda de antígenos y adyuvantes o antígenos recombinantes en forma de proteínas o en forma de ADN que protejan al huésped vertebrado (Carrión Herrero, 2007).

En los últimos años las investigaciones realizadas con cócteles de vacunas recombinantes multicomponentes, están demostrando ser más eficaces que las vacunas de antígenos, debido a que estas contienen mayor número de epítomos parasitarios que ayudan en la protección de organismos superiores como perros y humanos (Masina, M, Demotz, & Fasel, 2003)

Por otra parte, la detección temprana de la enfermedad permitiría un correcto tratamiento, también se evitaría que el parásito infecte órganos de gran importancia. La sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas depende del antígeno que se utiliza, y de factores intrínsecos a la técnica empleada, por esta razón la utilización de antígenos purificados en la técnica ELISA, permite que la técnica tenga una elevada sensibilidad y especificidad ya que evita reacciones cruzadas con la enfermedad de chagas, la cual también se encuentran dentro de la familia Trypanosomatidae (González García, 2003).

Por lo cual, el desarrollo de técnicas de diagnóstico serológicas rápidas y sensibles serian de gran ayuda en lugares muy alejados de ciudades y que sean de difícil acceso, así también la utilización de una o más pruebas, ayudaría a un mejor diagnóstico de la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En este sentido, nos preguntamos, si las histonas de *Leishmania* serán inmunogénicas en la infección de equinos y si estas podrán ser empeladas en la prevención y diagnóstico en la infección de leishmaniasis en equinos, por ende el presente estudio plantea evaluar por primera vez si las histonas de *Leishmania mexicana* son reconocidas por sueros de equinos infectados con *Leishmania amazonensis*.

El método a utilizarse se conoce como western blot, esta técnica consiste en realizar una electroforesis con las histonas de *Leishmania mexicana*, posteriormente transferirlas a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Sobre la membrana colocaremos los sueros de los equinos

infectados con *Leishmania amazonensis* de esta forma podremos conocer si los equinos están generando anticuerpos anti-histonas que reconozcan solo histonas del parásito.

1.4 Objetivo general

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

Objetivos específicos

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

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Histonas

Las histonas son un grupo de proteínas estructurales que juegan un importante papel en la organización y función del ADN, están altamente conservadas evolutivamente (Galanti, Galindo, Espinoza, & Toro, 1998) forman el nucleosoma y se dividen en cuatro dímeros que son H2A-H2B H3-H4 (Luger, Mader, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997).

También existe una quinta histona la H1, esta histona ayuda a aumentar al grado de plegamiento del ADN, que finalmente terminara con la construcción de la cromatina. Las histonas nucleosomales H2A, H2B, H3 y H4 son semejantes en diversas especies y son las proteínas más conservadas que se conocen, es así que las histonas de *Leishmania* presenta una gran similitud con histonas de eucariotas superiores principalmente en la región globular, sin embargo el extremo N-terminal es altamente divergente. También se conoce que la H1 es la histona más divergente entre especies (Galanti, Galindo, Sabaj, Espinoza, & Toro, 1998)

En la (figura 12) se puede observar como es la organización de las histonas nucleosomales H2A, H2B, H3 H4, y H1

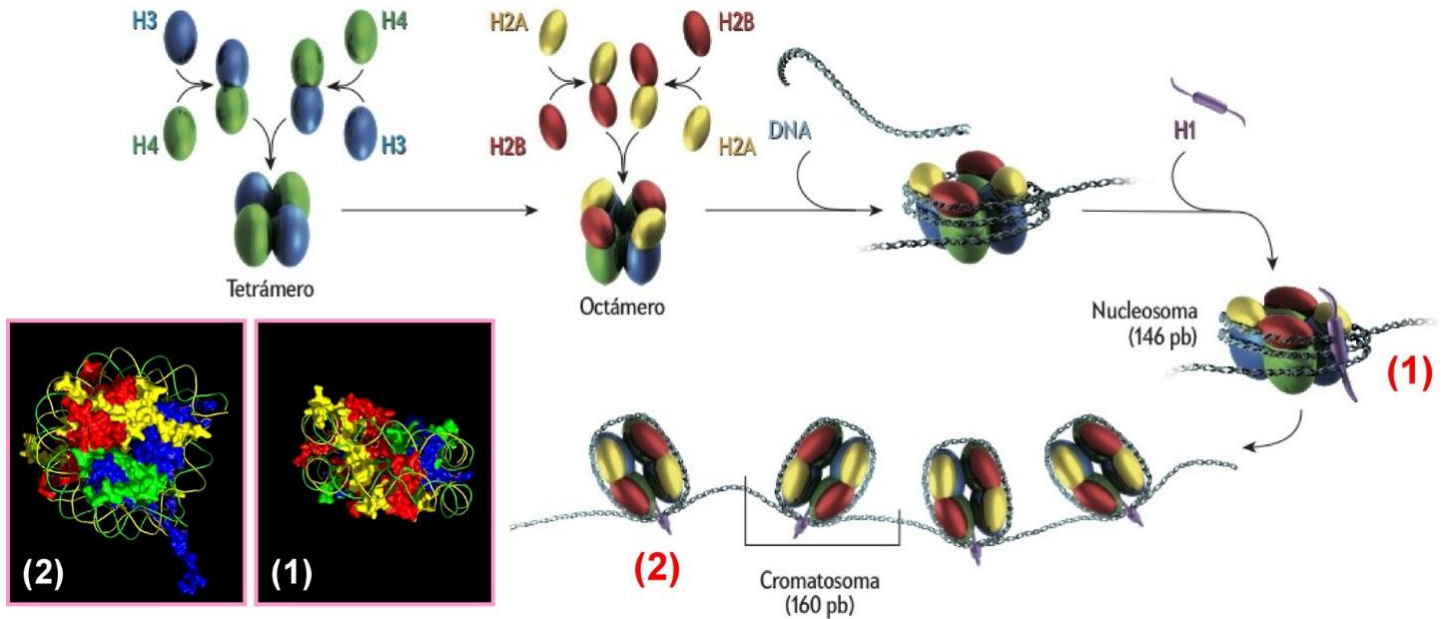


Figura 12. Histonas

Fuente: (Scilogs, 2013)

Se conoce que las histonas de los parásitos protozoos, pueden sufrir diversas modificaciones covalentes y post-traduccionales, generalmente ocurren en los extremos N-terminal, estas modificaciones son catalizadas por actividades enzimáticas. De acuerdo con la teoría del código de histonas existen numerosos factores como los reguladores transcripcionales, que poseen dominios capaces de reconocer estas modificaciones específicas en las histonas, constituyendo así un lenguaje empleado por los parásitos para dirigir las respuestas celulares (Strahl & Allis, 2000), por lo tanto se cree que estas modificaciones pueden estar implicadas en la virulencia (Sullivan, Jr, Naguleswaran, & Angel, 2006).

Por lo tanto, el estudio de las histonas de los protozoarios puede ser de gran utilidad para el desarrollo de vacunas y de tratamientos farmacológicos frente a enfermedades causadas por tripanosomátidos.

Diferentes estudios describen a las histonas como antígenos inmunodominantes, que son expuestos al sistema inmunitario del huésped vertebrado durante los procesos de infección natural y experimental, pues se ha encontrado en sueros de perros y seres humanos infectados con leishmaniasis anticuerpos anti-histonas del parásito (Nieto & col., 1999; Requena, Alonso,

& Soto, 2000). Manuel Soto y colaboradores fueron los primeros en estudiar la inmunogenicidad de las histonas nucleosomales de *L. infantum* (Soto, et al., 1996; Soto, et al., 1998).

2.2 Antigenicidad e inmunogenicidad de las histonas de *Leishmania*

En la actualidad diversos estudios señalan, que estas proteínas de localización nuclear, son reconocidas por el sistema inmunitario de organismos infectados con leishmaniasis tras la infección natural con el parásito, pues se ha detectado anticuerpos anti-histonas en los sueros de organismos infectados con leishmaniasis (Ramírez, et al., 2009).

Como se mencionó antes la inmunogenicidad de estas proteínas nucleosomales también ha sido demostrada en la leishmaniasis canina. En el trabajo realizado por Soto (1996) se investigó si los anticuerpos anti-histonas H3 y H2B encontrados en perros infectados con Leishmaniasis visceral son específicos contra el parásito.

En la investigación antes mencionada, se logró determinar que en los sueros de perros infectados con leishmaniasis visceral existen anticuerpos anti-H3, y estos son específicamente contra el parásito *Leishmania* y no contra otras histonas de mamíferos. En la (figura 16) en la línea 1 se encuentran histonas comerciales del timo de un becerro, mientras que en la línea 2 se encuentran fragmentos de histonas de *L. infantum*.

La (figura 16 A) muestra que mientras los sueros de perros infectados con leishmaniasis, reaccionan con algunas proteínas de la banda que contiene fragmentos de histonas de *L. infantum*, por otra parte los sueros no muestran reactividad con las histonas del timo del becerro, esto demuestra que los anticuerpos anti-histonas de sueros infectados con leishmaniasis visceral son reconocidos específicamente contra histonas del parásito (Soto, et al., 1996).

La (figura13 B) muestra que una sola banda reconoce el suero infectados con leishmaniasis visceral, como se muestra la purificación de anticuerpos no tiene reacción cruzada con las histonas H3 del becerro, (figura13 C) refuerza la conclusión que los

anticuerpos anti-H3 generados durante la infección con *Leishmania* son específicos contra la histona del parásito.

Los resultados presentados por (Soto, et al., 1996) confirman que 81% de los sueros de perros infectados con leishmaniasis visceral, reconocen la histona H3 del parásito así las histonas parecen ser antígenos inmunodominantes durante la leishmaniasis canina visceral, y pueden ser de gran ayuda para el diagnóstico serológico de la enfermedad.

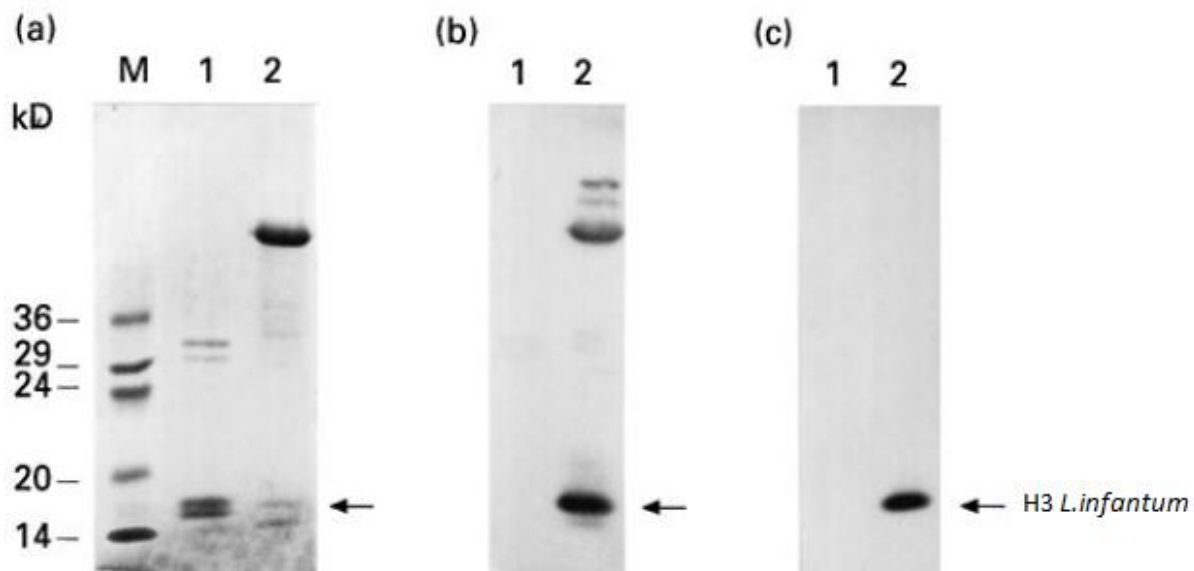


Figura 13. Análisis de especificidad de anticuerpos anti-H3 presente en sueros de perros infectados con leishmaniasis visceral.

Fuente: (Soto, et al., 1996)

También se ha demostrado que las histonas del parásito *Leishmania* sirven como antígenos en ratones los cuales han sido infectados experimentalmente con *L. infantum* y *L. major* (Iborra, Soto, Carrión, Alonso, & Requena, 2004).

Diversos trabajos señalan a estas proteínas como importantes, debido a que son reconocidas por el sistema inmunológico del hospedador y activan la respuesta inmunitaria en los sujetos afectados. Además se ha demostrado que las histonas nucleosomales de *Leishmania*, pueden activar la respuesta inmunitaria y ayudan a la protección del enfermo

durante la infección ya que generan una respuesta celular tipo Th1/Th2 (Iborra, Soto, Carrión, Alonso, & Requena, 2004; Carneiro, et al., 2012).

2.3 Vacunas desarrolladas utilizando histonas de *Leishmania*.

Diferentes estudios en animales experimentales han determinado que las histonas del parásito *Leishmania*, pueden inhibir el desarrollo de la enfermedad conocida como leishmaniasis a continuación se detallan investigaciones donde se desarrollaron vacunas utilizando histonas de *Leishmania*.

Una de las vacunas experimentales propuestas contra leishmaniasis consiste en la construcción de plásmidos de ADN que contengan fragmentos de histonas H3, H4, H2A, H2B de *L. infantum*, posteriormente un grupo de ratones hembra BABL/C fueron infectadas con *L. major* seguidamente de las inmunizo con los cuatro tipos de plásmidos H2A, H2B, H3, H4 por vía intramuscular (Iborra, Soto, Carrión, Alonso, & Requena, 2004).

En el experimento se midió la cantidad de células producidas por el sistema inmunitario de los ratones, dando como resultado un aumento significativo de células T (CD4 + y CD8+) y la producción de INF- γ células que interviene en la eliminación del parásito (Iborra, Soto, Carrión, Alonso, & Requena, 2004).

De igual manera (Carneiro, et al., 2012) realizaron vacunas con plásmidos de DNA que contenían histonas H2A, H2B, H3, H4 de *L. infantum* las vacunas fueron administradas a un grupo ratones BALB /c hembra que habían sido infectadas con *L. braziliensis*, los resultado de la inmunización con histonas determinaron que estas proteínas impiden el desarrollo de lesiones que produce la leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis*. (Carneiro, et al., 2012).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Área de estudio

Las muestras fueron tomadas en la provincia del Napo Ecuador por investigadores del Centro Internacional de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador, entre las parroquias Gonzalo Díaz de Pineda, Santa Rosa de Quijos y Sardinas. En la (figura 14) se detalla los lugares de toma de muestras. La provincia del Napo ocupa un 10,7% de la Amazonía Ecuatoriana tiene una extensión de 12 504 km², su variación altitudinal está entre los 400 y 5700 msnm, es decir la provincia se extiende desde las zonas tropicales bajas de la Amazonía, zonas templadas de bosques nublados hasta las zonas alto-andinas de páramo (Gobierno Autónomo Descentralizado Provincia de Napo, 2015).

Debido a sus diferentes rangos altitudinales, existe una gran diversidad de fauna y flora razón por la cual, es considerado como uno de los “puntos calientes” (hotspots). La temperatura promedio es de 25 °C, llegando a ser la más baja 9 °C y la más alta 28 °C tiene una precipitación media superior a los 3.000 mm. Además cuenta con varios pisos climáticos cada uno con precipitación, humedad y temperatura (Gobierno Autónomo Descentralizado Provincia de Napo, 2015) .

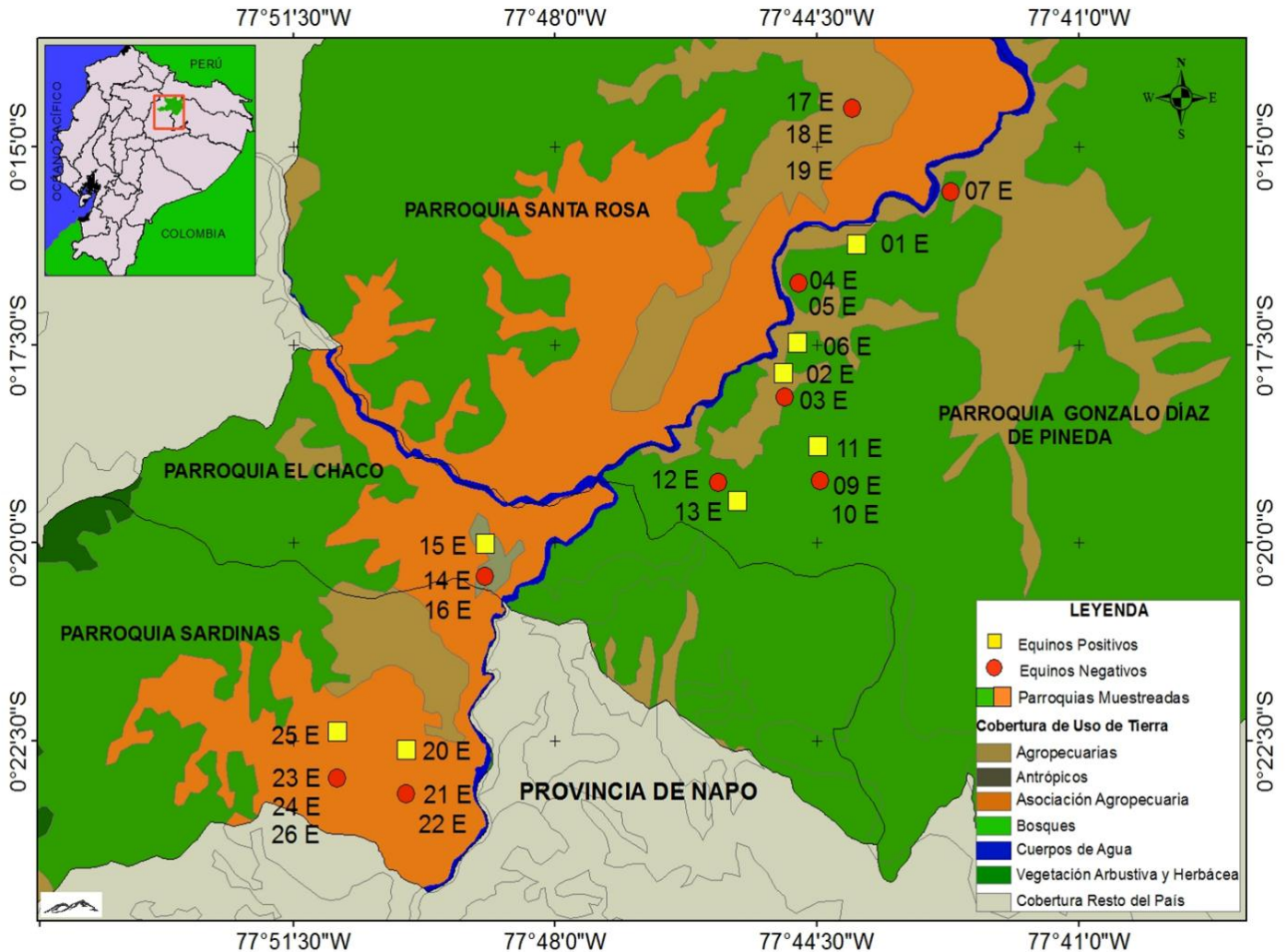


Figura 14. Equinos infectados con *Leishmania* spp.

Fuente: (Enriquez,2016)

Los sueros de los equinos fueron sometidos a técnicas parasitológicas y moleculares, se encontró que la especie infectante fue *Leishmania amazonensis*, la cual fue identificada mediante el secuenciamiento de productos de amplificación de la región del espaciador ribosomal interno-1 (ITS-1). Los sueros de 11 equinos fueron diagnosticados como positivos para *Leishmania* (comunicación personal Graciela Uzcanga).

3.2 Cultivo del parásito

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

3.3 Aislamiento de Histonas de *Leishmania mexicana*

Promastigotes de *Leishmania spp.* en fase semi-logarítmica fueron sedimentados, lavados con PBSG frío y congelados. Posteriormente fueron lisados en buffer hipotónico [10 mM TRIS-HCL (pH 8), 1 mM KCL, 1,5 mM Mg CL₂, 1 mM de DTT] suplementado con inhibidores de proteasas.

Los núcleos liberados fueron sedimentados por centrifugación 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C, resuspendidos en 0.4 N H₂SO₄ e incubados en toda la noche en agitación a 4 °C. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 16.000 x g por 10 minutos para eliminar el debris celular. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a tubos limpios y las histonas fueron precipitadas mediante la adición de 8 volúmenes acetona fría y la incubación a -20 °C por 3 horas. El precipitado fue centrifugado a 16000 x g por 10 minutos y fue lavado dos veces con acetona. Por último, el sedimento fue secado a temperatura ambiente y re suspendido en buffer 50 mM Tris-HCL, pH 6,8 con inhibidores de proteasas. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Qubit obteniéndose una concentración de 115 µg/mL.

3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó en base al método descrito por Laemmli (1970), la cámara de electroforesis utilizada fue la Mini -vertical Slab Gel / Blotting System DCX-700.

Se preparó el gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se utilizó un peine preparativo el cual contenía dos pocillos, uno para el marcador y otro para la muestra. Posteriormente se armó la cámara de electroforesis, el buffer de corrida utilizado fue (25mM Tris NaCl, 192 mM Glicina, 0,1 % SDS, pH 8.5). Se dejó correr durante 1 hora a 80 V, luego se cambió el voltaje a 120V y se dejó correr hasta que la muestra llegue al final del gel.

Para determinar el peso molecular de las histonas de interés H3 y H4 en el gel de poliacrilamida, nos sustentamos en la comunicación personal de la Dra. Graciela Uzcanga (2015) que realizó un western blot con histonas de pollo e histonas de *Leishmania mexicana*, mediante el uso de anticuerpos comerciales anti-histonas, consiguió determinar el peso molecular de las histonas H3 y H4 que es :15 Kda y 14kda como se muestra en la figura 15.

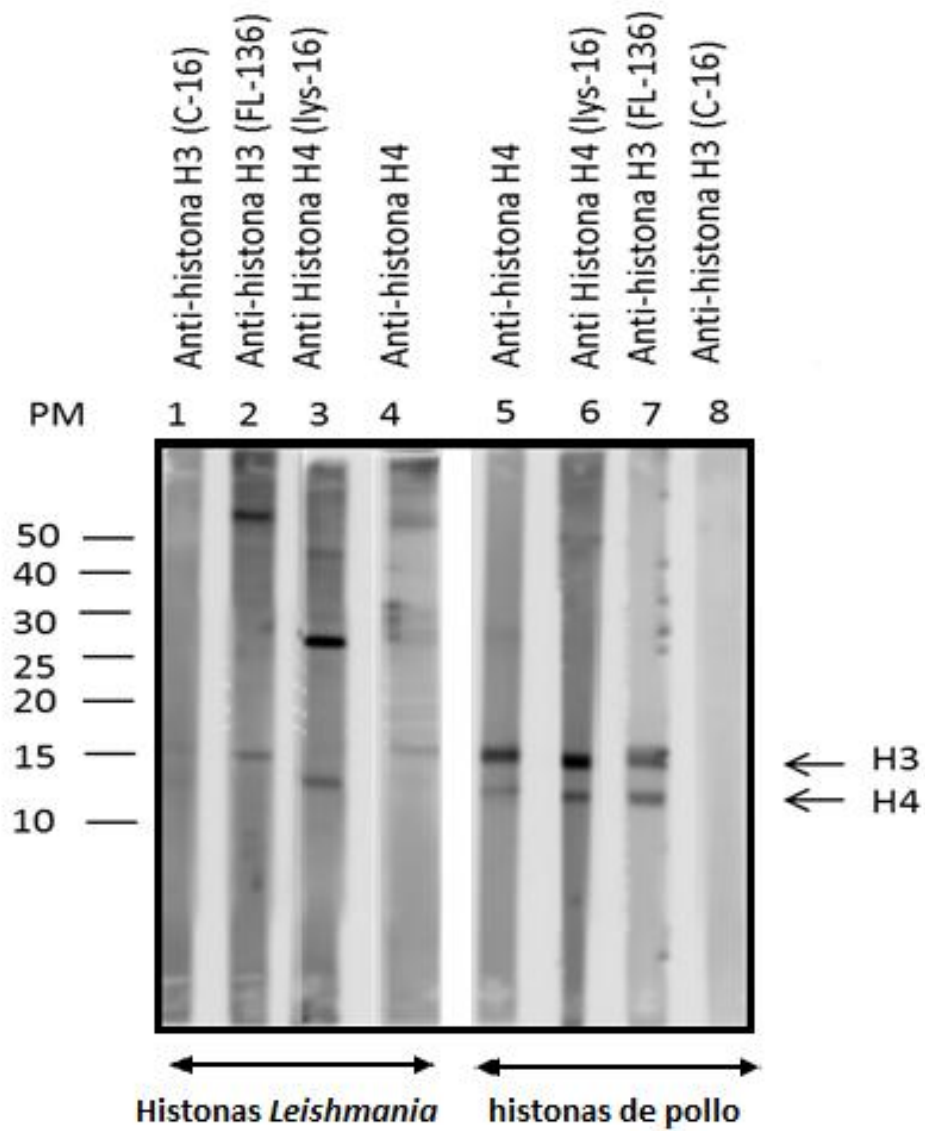


Figura 15. Western blot histonas de *Leishmania mexicana*

Fuente: (comunicación personal Uzcanga, 2015)

3.5 Método analítico western blot

Para realizar el western blot se siguieron los siguientes pasos descritos en la figura 16

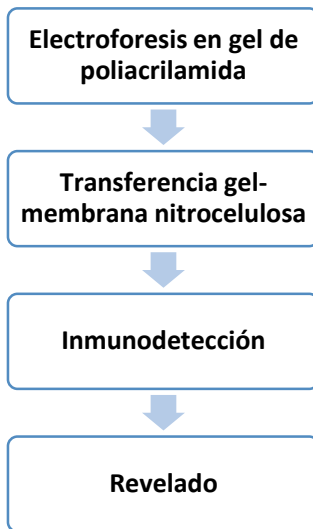


Figura 16. Esquema de western blot

Elaborado: (Ramos, 2016)

Transferencia de las proteínas de gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa

Se realizó el montaje del sándwich, como se describe en la (figura 17) y se lo acopló en la cámara de electroforesis, el buffer de transferencia utilizado fue (Tris Glycina Buffer pH 8,3, metanol 10% v/v)..Se dejó correr durante 90 minutos a 185 V.

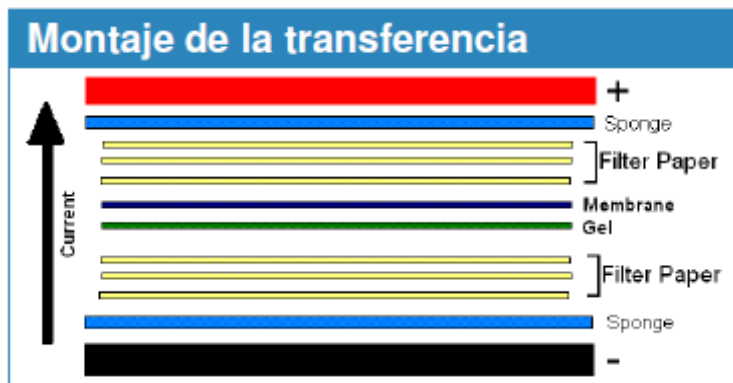


Figura 17. Esquema del montaje del sándwich

Fuente: (Veiga, 2013)

Las transferencias fueron teñidas con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas, como se muestra en la figura 18. Se dejó secar la membrana de nitrocelulosa por 1 día a temperatura ambiente.

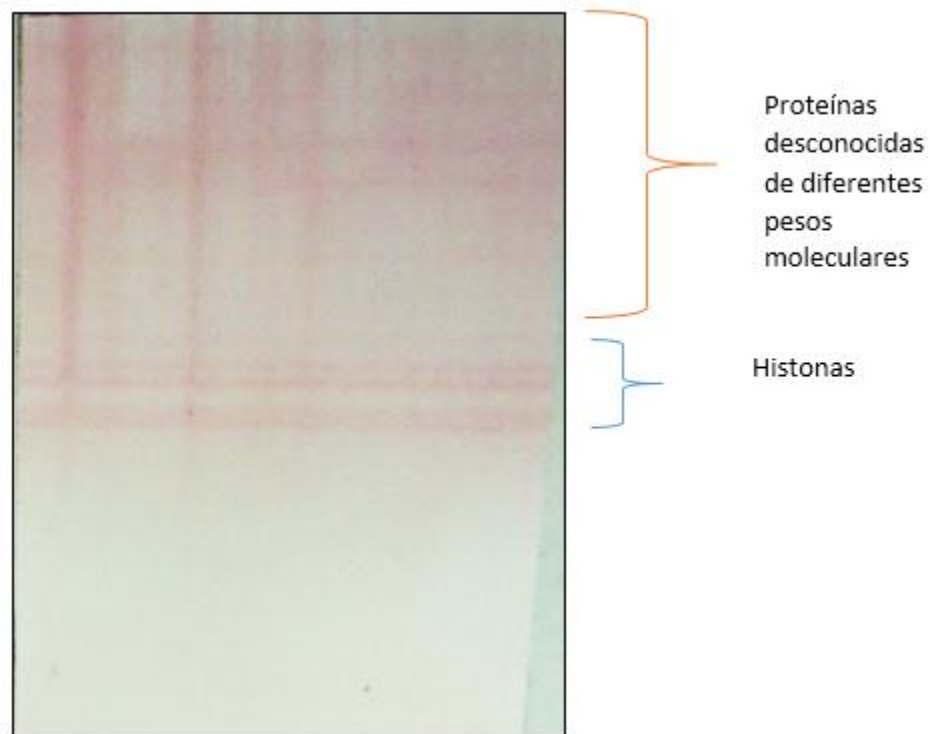


Figura 18. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau

Fuente: Ramos, 2016

Se marcó con un lápiz la zona transferida, se dejó un espacio de 1 cm para el marcador y se procedió a hacer pequeñas marcas de 2mm de distancia. Se cortó con un bisturí (sin tocar el lugar de la transferencia), se etiquetó cada tirilla con números y se las colocó en tubos de vidrio.

Inmunobloting o Inmundefección

Para realizar la inmunodetección, se preparó Tris buffer fosfato salino TBST (20mM Tris 150mM NaCl pH 8,3 0,1% tween 20) se utilizó 30mL de TBST más 5% leche descremada para la solución bloqueante. Se colocó 3,75 mL de solución bloqueante en cada tubo de vidrio, se incubó durante 1 hora en movimiento a temperatura ambiente.

Posteriormente se botó la solución bloqueante y se realizó 3 lavados con 1250 μL de (TBST), en movimiento, el tiempo de lavado fue de 5 minutos.

Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario para lo cual se realizó la dilución de los sueros de equinos 1:100, se colocó 1250 μL de (TBST) más 125 μL de suero y se colocó en cada tubo de vidrio. Se dejó incubar durante 1 hora en movimiento a temperatura ambiente.

Seguidamente se procedió a botar el suero se realizó 3 lavados con 1250 μL de (TBST) en movimiento, el tiempo de lavado fue de 5 minutos.

Para la solución conjugante se utilizó la proteína A-peroxidasa, se diluyó 5 μL de conjugado en 30 mL de (TBST). Se colocó 1mL de conjugado en cada frasco, se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente. Al otro día, se realizó 3 lavados con 1250 de μL (TBST) en movimiento, el tiempo de lavado fue de 5 minutos. El esquema de lo pasos realizados en la inmunodetección se describe en la (figura 19).

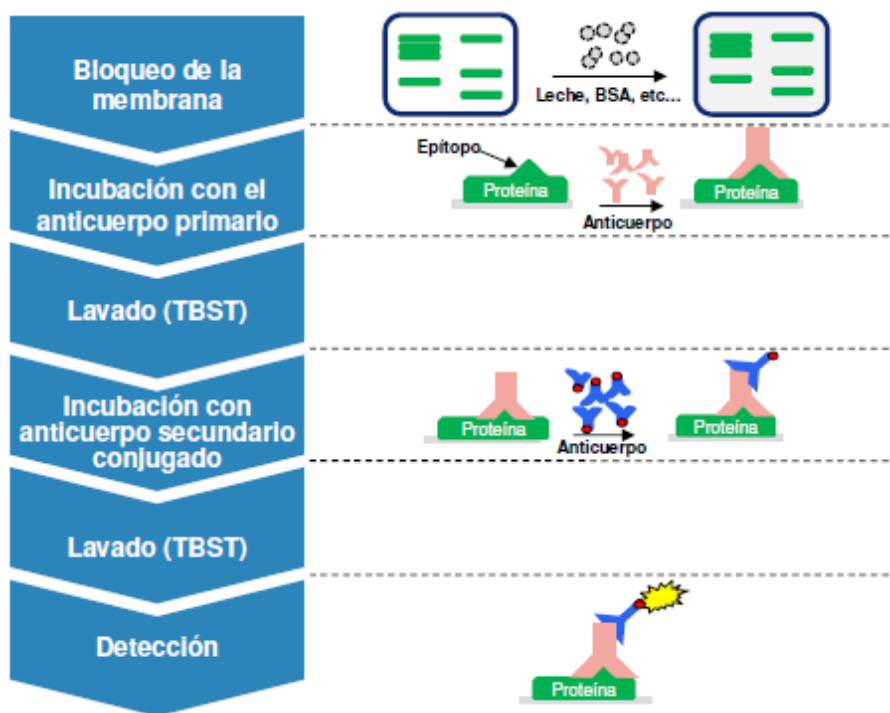


Figura 19. Esquema de la inmunodetección

Fuente: (Veiga, 2013)

Revelado

Para el revelado se utilizó el kit Clarity™ Western ECL blotting substrate, se colocó en un recipiente 2mL de cada frasco del kit, posteriormente se colocaron todas las tirillas y se dejó reposar durante 3 minutos.

El marcador de peso molecular fue señalado con un lápiz fluorescente en cada banda. Finalmente se colocó ordenadamente cada tirilla en el equipo de revelado junto con el marcador de peso molecular, se esperó durante 6 minutos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados

4.1.1 Cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Promastigotes del parásito *Leishmania mexicana*, crecieron en medio Schneider suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10%, mediante microscopia se logró observar los promastigotes, como se muestra en la figura 20.



Figura 20. Cultivo del parásito *Leishmania* en medio Schneider

Fuente: (Uzcanga, 2016)

4.1.2 Aislamiento de histonas de *Leishmania mexicana*

El aislamiento de las histonas H3 y H4 de *Leishmania mexicana*, se realizó utilizando la metodología descrita en el presente trabajo, en la figura 21 se puede observar las histonas aisladas en el gel de poliacrilamida 15%.

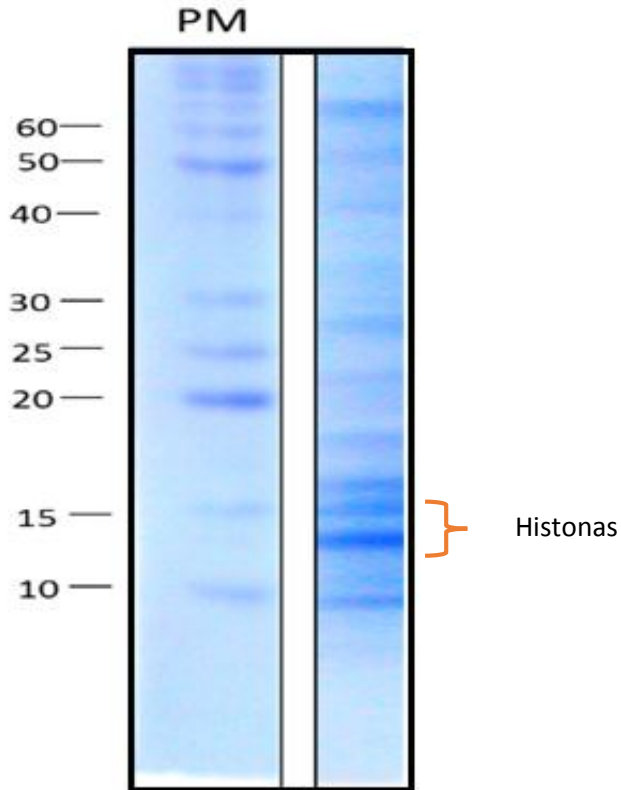


Figura 21. Gel de Poliacrilamida 15%

Fuente: (Ramos, 2016)

4.1.3 Evaluación de histonas de *Leishmania mexicana*

En el presente trabajo se analizó un total de 18 sueros de equinos, 11 sueros positivos para *Leishmania amazonensis* y 7 sueros negativos; mediante el uso del método western blot se logró determinar que los 11 sueros positivos reconocieron las histonas H3 y H4, excepto la tirilla 9 que no tuvo ningún reconocimiento, mientras que los 7 sueros negativos reconocieron la histona H3 y no hubo reconocimiento de la H4, como se muestra en la figura 22.

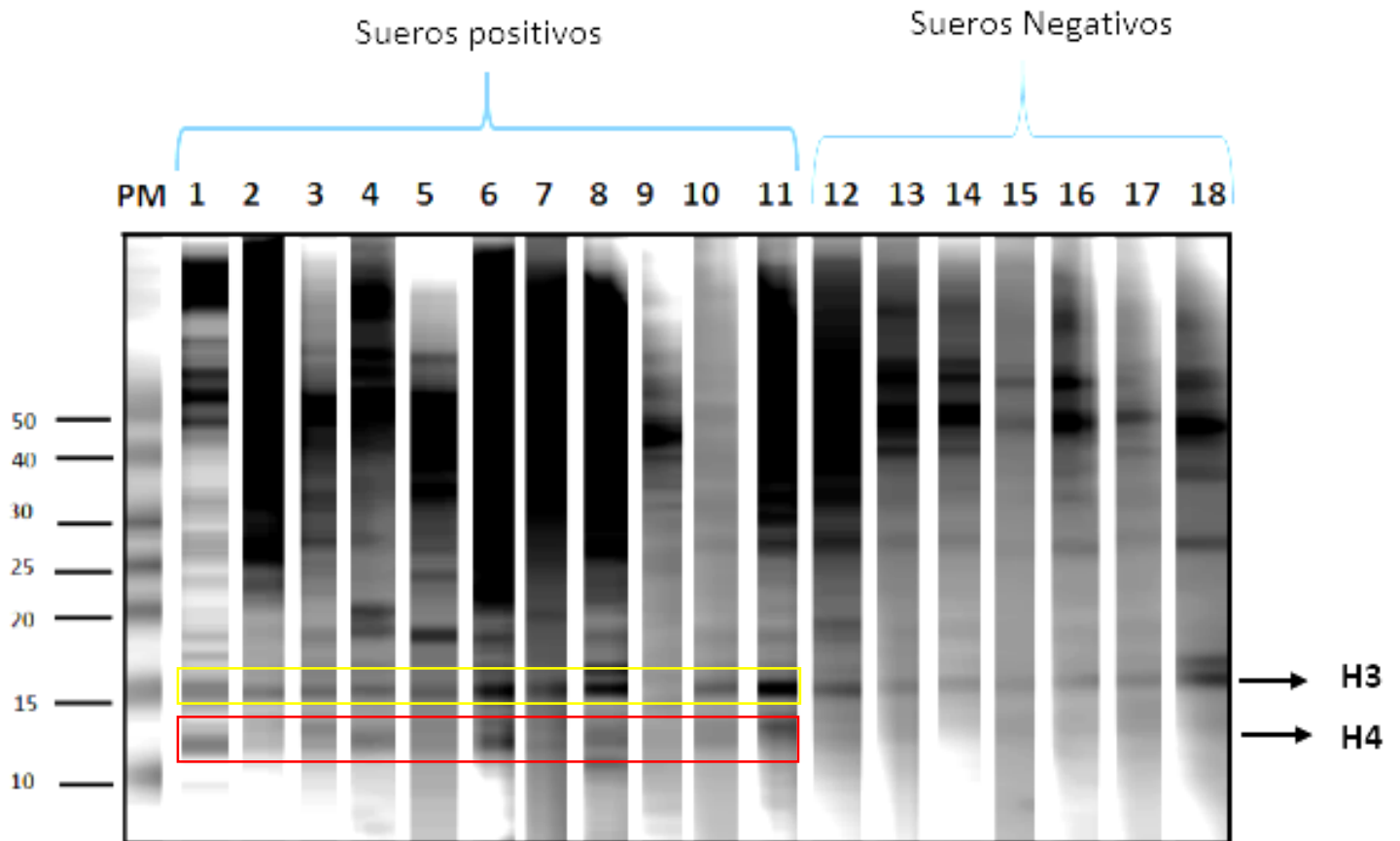


Figura 22. Western blot de sueros de equinos

Fuente: (Ramos, 2016)

La frecuencia de reconocimiento de los 11 sueros de equinos positivos infectados con *Leishmania amazonensis*, para la histona H3 fue de 91% (10/11), las tirillas 1,2,3,4,5,6,7,8,10 reconocieron esta histona, mientras que la histona H4 tuvo un reconocimiento de 63,63% (7/11), las tirillas 1,3,4,6,8,10,11 reconocieron esta histona. En la figura 23 se observar el reconocimiento de los 11 sueros positivos en porcentaje.

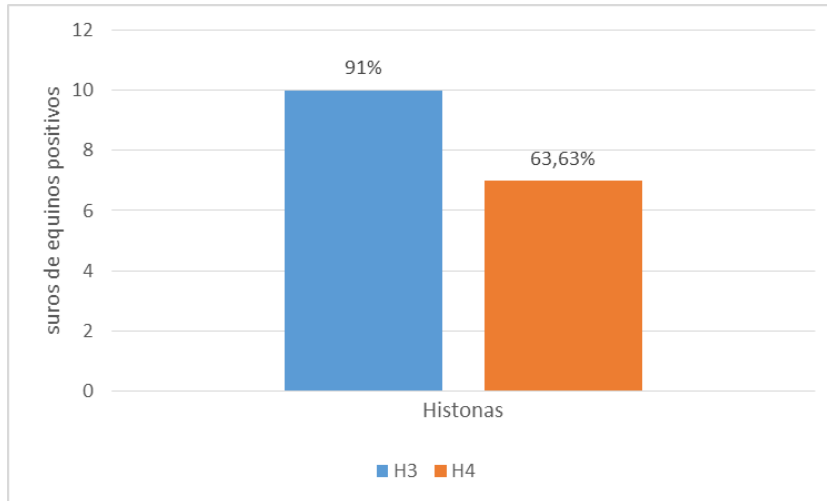


Figura 23. Reconocimiento de sueros de equinos positivos

Fuente: (Ramos, 2016)

4.2 Discusión

Actualmente en Ecuador no se conoce cuál es el grado de infección de equinos en zonas endémicas de *Leishmania*, y si estos podrían estar involucrados en el elevado índice de casos de infección con *Leishmania* en seres humanos, como se muestra en la gaceta epidemiológica del ministerio de Salud (2015). Sin embargo diferentes estudios realizados en sur América, señalan que los equinos que viven en zonas endémicas de *Leishmania* estarán en contacto con el parásito, por lo que podrían contraer la infección en cualquier momento (Truppel , et al., 2014).

De la misma forma en Ecuador no existe un registro oficial de cuáles son los animales domésticos más afectados; sin embargo Calvopina (2004) señala que los perros pueden ser huéspedes reservorios de *Leishmania*.

En los caballos es muy difícil detectar la enfermedad a simple vista debido a que muchos no presentan signos clínicos de estar infectados (The Center for Food Security Public Health, 2010), sin embargo cuando se encuentran lesiones cutáneas en el animal se puede utilizar métodos parasitológicos para su diagnóstico (Morales B, et al., 2010).

No obstante para un mejor diagnóstico, se puede utilizar métodos indirectos como; ELISA, PCR entre otros (Alvar , 2001), actualmente la elevada presencia de anticuerpos anti-

histonas en sueros de perros y humanos (Soto, et al., 1996; Soto, et al., 1998) generados durante la infección con *Leishmania*, indican que las histonas nucleosomales tiene una alto potencial para el desarrollo de diagnósticos serológicos de *Leishmania*.

De acuerdo con Soto (1998) la frecuencia de reconocimiento de anticuerpos anti-histonas en sueros de perros infectados con *Leishmania infantum* son las siguientes: H2A (72%), Histona H3 (68%) Histona H2B, (60%) Histona H4 (44%).

Así también en nuestro estudio se logró determinar que, los sueros de equinos infectados con *Leishmania amazonensis* reconocen las histonas H3 y H4, pero también se encontró que los sueros negativos reconocen la histona H3.

De acuerdo con las investigaciones realizadas por Soto (1996) (1998), Ramírez (2009) los anticuerpos anti-histonas de *Leishmania*, generados durante la infección, son capaces de reconocer específicamente histonas del parásito, sin embargo existe otro parásito que se encuentra dentro de la familia Trypanosomatidae, enfermedad conocida como chagas producida *Trypanosoma cruzi*, debido a que las histonas son proteínas muy conservadas evolutivamente, se cree que puede existir una reacción cruzada con las histonas de parásitos de la familia Trypanosomatidae, sin embargo esto no ha sido comprobado.

Por lo tanto, se cree que en nuestro trabajo puede existir una reacción cruzada con las histonas de parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, también se plantea otra hipótesis para el reconocimiento de la histona H3 por parte de los 7 sueros de equinos negativos. De acuerdo a la investigación realizada por Fernández y colaboradores (2005) señalan que los equinos infectados con *Leishmania* son capaces de generar respuesta celular y humoral, generando así la producción de anticuerpos anti-*Leishmania*, dentro de los cuales se encontrarían anticuerpos anti-histonas.

Por otro lado y en conclusión con todas las investigaciones realizadas hasta la fecha para el desarrollo de vacunas experimentales en las cuales se utiliza fragmentos de histonas nucleosomales H3, H4, H2A, H2B de *Leishmania*, serían de gran ayuda debido a que la mayoría de los animales(ratones) infectados experimentalmente con *Leishmania*, inhibieron en el desarrollo de la enfermedad o presentaron lesiones pequeñas que, sin el uso de las vacunas

hubieran sido más comprometedoras para en animal (Carneiro, et al., 2012; Iborra, Soto, Carrión, Alonso, & Requena, 2004).

También se ha demostrado que la inmunización con plásmidos que contengan los cuatro tipo de histonas nucleosomales tiene mejores resultados que la inmunización individual con cada histona (H2A, H2B, H3, H4) (Carrión , Folgueria, & Alonso , 2008).

En consecuencia la inmunización con vacunas que contengan histonas de *Leishmania* probablemente es uno de métodos más recomendables para los animales que habitan en zonas tropicales, se lograría que el animal genere una respuesta activa. La mayoría de los animales en los cuales se ha probado estas vacunas experimentales han sido ratones BALB /c y perros sin embargo no se debería descartar la posibilidad de la inmunización en equinos con vacunas que contengan histonas de *Leishmania* y que estos generen una respuesta inmunitaria parecida a la de perros y ratones.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

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

5.2 Recomendaciones

En el laboratorio, se recomienda trabajar con todas las medidas de bioseguridad, utilizar en todo momento el equipo de protección personal principalmente guantes y mandil.

Se recomienda mantener condiciones de asepsia en el laboratorio, y trabajar en la cámara de flujo laminar, especialmente al momento de realizar el cultivo del parásito debido a que el medio de cultivo es muy susceptible a la contaminación con otros microorganismos.

También se recomienda mejorar la metodología empleada en el aislamiento de histonas, si bien, se logra el aislamiento de estas, se puede encontrar una gran cantidad de proteínas de altos pesos moleculares en el gel del poliacrilamida.

Para futuros estudios de leishmaniasis en equinos se recomienda elevar el tamaño de muestras, también se recomienda estudiar cual es la función de los equinos dentro del ciclo de vida del parásito.

Con respecto al estudio de las histonas nucleosomales como posibles proteínas utilizadas para el desarrollo de diagnósticos serológicos en equinos, se recomienda estudiar el reconocimiento que tienen los sueros de equinos para las histonas H2A, H2B y H1, pues tal vez exista un reconocimiento más específico hacia cualquiera de estas histonas, y se podría mejorar el desarrollo de métodos diagnósticos en equinos.

También se recomienda estudiar cuales son los equinos más propensos a infectarse con el parásito *Leishmania*, pues no se ha logrado determinar si los caballos, burros o mulas, presentan fenotipos que los hace más susceptibles unos de otros.

CAPÍTULO VI

6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Alexander , J., & Bryson , K. (2005). T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*, 17-23.

Alexander, J., Satoskar, A. R., & Russell, D. G. (1999). Leishmania species : models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, 2993-3002.

Alvar , j. (2001). *Las leishmaniasis : De la Biología al control* . Madrid .

Antoine, J.-C., Prine, E., Courret, N., & Lang, T. (2004). Leishmania spp: on the Interactions They Establish with Antigen-Presenting Cells of their Mamalian Hosts. *Advances in parasitology*, 58.

Armijos, R. X., Weigel , M. M., Izurieta, R., Racines, j., Zurita, C., Herrera, W., & Vega, M. (1997). *The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador*. Tropical Medicine and International Health.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., . . . Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu.Rev.Immunol*, 767-811.

Baratta-Masini, A., Texeira-Carvalho, A., Malanquias, L. C., Mayrink, W., Martins-Filho, O. A., & Correa-Oliveira, R. (2007). Mixed cytokine profile active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci*, 839-49.

Cabral , M., Grady, J. E., Gomes, S., Sousa, J. C., Thompson , H., & Alexander, J. (1998). The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 76, 173-180.

- Calvopina, M., Armijos, R. X., Marco, J. D., Uezato, H., Kato, H., Gomez, E. A., . . . Hashiguchi, Y. (2006). Leishmania isoenzyme polymorphisms in Ecuador: Relationships with geographic distribution and clinical presentation.
- Calvopina, M., Armijos, R., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge-A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 663-672.
- Carneiro, M., Santos, D., Fukutani, K., Clarencio, J., Miranda, J. C., Broskyn, C., . . . de Oliveira, C. (2012). Vaccination with *L. infantum* changai Nucleosomal Histones Confers Protection against New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*.
- Carrión, J., Folguera, C., & Alonso, C. (2008). Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: The results of immunogenicity and multicomponent properties of Hsitone DNA vaccine. *ELSEVIER*.
- Carrión Herrero, J. (2007). *Establecimiento de un modelo experimental para el estudio de la leishmaniosis .Estrategias de inmunizacion con las histonas de leishmania frente a la leishmaniosis cutánea y visceral (Tesis Doctoral)*. Madrid.
- Center for Disease Control and Prevention. (2015). *CDC*. Retrieved from CDC: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., . . . Boelaert, M. (2007). Visceral Leishmaniasis : What are the needs for diagnosis, treatment and control ? *Nature reviews microbiology*, 872-879.
- Colmenares, M., Corbí, A. L., Turco, S. J., & Rivas, L. (2004). The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Dsicriminates among species and life cycle forms of leishmania. *The Journal of Immunology* , 1186-1190.
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. *Elsevier*.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology microbiology infection diseases*, 305-318.

- ECOCIENCIA . (2008). *Caracterización Ecológica de la Provincia del Napo*.
- Fernández-Bellon , H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., & Lluís, F. (2005). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Elsevier*.
- Galanti, N., Galindo, M., Espinoza, I., & Toro, G. C. (1998). Histone Genes in Trypanosomatids. *Elsevier*.
- Galanti, N., Galindo, M., Sabaj, V., Espinoza, I., & Toro, G. C. (1998). Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today*, 64-70.
- Gálvez Esteban , R. (2011). *Factores que influyen sobre la epidemiología de la leishmaniasis canina y sus vectores en la comunidad de Madrid : obtencion de modelos predictivos de riesgo mediante sistemas de informacion geográfica (Tesis Doctoral)*. Madrid.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Provincia de Napo. (2015). *Plan de desarrollo Provincial y de ordenamiento territorial*.
- González García, A. C. (2003). Tesis. *Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a leishmaniasis*.
- Gordon , S. (2002, December 27). Pattern recognition Receptors :Doubling Up for the innate Immune Response. *111*, 927-930.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of Zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control . *International Journal for Parasitology* , 1169-1180.
- Hadman, E. (1992). Host-Parasite Interactions in Leishmaniasis. *Advances in Molecular and Cell Biology* , 133-155.
- Hall, L. R., & Titus, R. G. (1995). Sand fly vector saliva selective modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production . *The Journal Immunology* , 3501-6.
- Hashiguchi, Y., & Gómez Landires, E. A. (1990). *Las investigaciones sobre la Leishmaniasis en el Ecuador 1920-1989*. Bulletin of the Pan American Health Organization.

- Iborra, S., Soto, M., Carrión, J., Alonso, C., & Requena, J. M. (2004). Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Elsevier* .
- Ilg, T. (2001). Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania* : stage-and specie-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Springer-Verlag*, 13-17.
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopina, M., Marco, J. D., Barroso, P. A., . . . Hashiguchi, Y. (2005). Detection and identification of leishmania species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87-93.
- Kaye, P. M., Svensson , M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., . . . Engwerda, C. R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews*, 239-253.
- Laufs, H., Muller, k., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., . . . Laskay, T. (2002). Intracellular Survival of *Leishmanis major* in Neutrophil Granulocytes after uptake in the Abscence of Heat-Labile Serum Factors. *70*, 826-835.
- Lima, G. M., Vallochi, A. L., Silva, U. R., Bevilacqua, E. M., Kiffer, M. M., & Abrahamsohn, I. A. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunology Letters*(64), 145-51.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosomal core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*.
- Martinez Salazar , B., Berzunza-Cruz, M., & Becker, I. (2008). El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrofago murino e induce el aumento en la expresion de TLR9. *144*(2).
- Masina, S. M., M, G., Demotz, S. O., & Fasel, N. J. (2003). Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recobinant histone H1 antigen . *J Infect Dis*, 1250-7.

- Minero, M. A., Chinchilla, M., Guerrero, O. M., & Castro, A. (2004). Infección de fibroblastos de piel de animales con distinto grado de susceptibilidad a *leishmania infantum* y *leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Biología Tropical*, 52(1), 261-267.
- Ministerio de Salud Pública Ecuador. (2015). *Gaceta Epidemiológica Ecuador SIVE – ALERTA N° 53*. Quito. Retrieved from <http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta/>
- Morales B, A. A., García, F., Rossini, M., Comerma S, S., Chacón, T., Herrera, L., & Gómez, M. S. (2010). Lesiones Cutaneas Parasitarias en el asno equus asinus de Choroní, Estado Aragua, Venezuela. *Neotropical Helminthology*, 4(2), 179-182.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 1561-77.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., . . . Mantovani, A. (2000). Differential Expression and Regulation of Toll-like Receptors (TLR) in human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *The Journal of immunology*.
- Niederwieser, I. (2004). *Leishmania infantum: molecular analysis for identification of potencial virulence factors and genes of diagnostic use*. Basel.
- Nieto, C. G., García Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., & Navarrete, I. (1999). Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 117-30.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Control de las leishmaniasis*. Ginebra.
- Organización Panamericana de la salud. (2005). LEISHMANIASIS Informe Epidemiológico de las Américas. *Organización Panamericana de la salud*, 1-5.
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). Leishmaniasis en las Américas recomendaciones para el tratamiento. *Organización Panamericana de la Salud*.

- Organización Panamericana de la Salud. (2014). pequeñas picaduras grandes amenazas. *Organización Panamericana de la Salud*. Retrieved from www.paho.org/leishmaniasis
- Pan American Health Organization. (2013). Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. *Pan American Health Organization*. Retrieved from <http://www.paho.org/leishmaniasis>
- Ramírez, L., Iborra, S., Indiani de Oliveria, C., Weber, M., Abánades, D. R., González, V. M., . . . Soto, M. (2009). Las histonas de Leishmania. 129-133.
- Requena, J. M., Alonso, C., & Soto, M. (2000). Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. *Parasitol Today*, 246-50.
- Rousseau, D., Demartino, S., Ferrua, B., Michiels, J. F., Anjuere, F., Fragaki, K., . . . Kubar, J. (2001, August). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in leishmania infantum infection. *BMC Microbiology*.
- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in Leishmania Promastigotes. *Experimental Parasitology*(69), 100-103.
- Sacks, D., & Anderson, C. (2004). Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice. *Immunological Reviews*, 225-238.
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular Aspects Of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu.Rev.Microbiol.*
- Sacks, D., & Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. *Nature Reviews Immunology* 2, 2, 845-855.
- Schlein, Y. (1993). Parasitology Today. *Leishmania and Sandflies : Interactions in the life cycle and transmission*, 9(7), 255 -257. Elsevier.
- Scilogs. (2013). Retrieved from <http://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/28/posts/epigenetica-caracteres-adquiridos-sobre-nuestros-genes-11009>

- Scott, P., & Hunter, C. (2002). Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Elsevier*.
- SNEM. (2013). *Vigilancia y Control de Vectores para la Prevención de la transmisión de Enfermedades Metaxénicas en el Ecuador*. Guayaquil.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Gomez, L. C., Guzman, F., Patarrayo, M. E., & Alonso, C. (1996). Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Blackwell Science*.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Perez, M. J., Nieto, C. G., Guzman, F., & Patarrayo, M. E. (1998). Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Blackwell Science*, 342-349.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications . *Nature*, 41-5.
- Stuart, K., Brun , R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R. E., Mc Kerrow, J., . . . Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids :related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1301-1309.
- Sullivan , W. J., Jr, Naguleswaran, A., & Angel, S. O. (2006). Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol*.
- Texeira, M. J., Romero Texeria, C., Bezerril Andrade , B., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Inmunoparasitology series*, 22(1), 32-39.
- The Center for Food Security Public Health. (2010). Leishmaniasis (cutánea y visceral). 1-9.
- Truppel , H. J., Otomura, F., Teodor, U., Massafera, R., Viera Costa-Ribeiro, M. C., Motter Catarino, C., . . . Thomas-Soccol, V. (2014). Can Equids Be a Reservoir of *Leishmania braziliensis* in Endemic Areas ? *Plos One*.
- Vedovello Filho, D., Jorge, F. A., C. Lonardoni, M. V., Teodoro, U., & V. Silveira, T. G. (2008). American Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the

North -Central Mesoregion of Paraná State , Brazil. *Zoonoses Public Health*, 149-155.

Veiga, A. (2013). *abcam*. Retrieved from

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=15542>

Von Stebut, E., Ehrchen, J. M., Belkaid, Y., Lopez Kostka, S., Molle, K., Knop, J., . . . Udey, M. C. (2003). interleukin 1 Promotes Th1 Differentiation and Inhibits Disease Progression in Leishmania major-susceptible BALB/c Mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 191-199.

Wolday , D., Akuffo, H., Demissie, A., & Britton , S. (1999). Role of leishmania donovani and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell Activation-Induced Human Immunodeficiency virus replication. *Infection and Immunity*, 67(10), 5258-5264.