

Universidad de Granada
Departamento de Parasitología
Facultad de Ciencias



Purificación de una Superóxido Dismutasa
Excretada por parásitos del género *Leishmania*
(*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. peruviana* y *L. braziliensis*)
y su uso para el Diagnóstico Clínico de la Leishmaniasis

Silvia Stefania Longoni

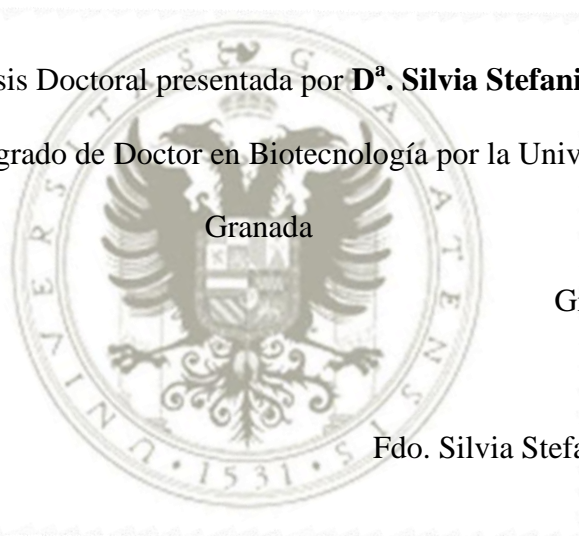
Tesis Doctoral en Biotecnología con Mención Internacional

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Silvia Stefania Longoni
D.L.: GR 90-2014
ISBN: 978-84-9028-667-8

Purificación de una Superóxido Dismutasa
Excretada por parásitos del género *Leishmania*
(*L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. peruviana* y *L. braziliensis*)
y su uso para el Diagnóstico Clínico de la Leishmaniasis

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **D^a. Silvia Stefania Longoni**
para aspirar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad de
Granada



Granada, 2013

Fdo. Silvia Stefania Longoni

LOS DIRECTORES DE LA MEMORIA

D. Manuel Sánchez Moreno
Catedrático de Parasitología
Universidad de Granada

Dra. Clotilde Marín Sánchez
Profesora Titular de Parasitología
Universidad de Granada

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la Beca-FPU concedida por
el Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno de España.

La doctoranda Silvia Stefania, Longoni y los directores de la tesis Dr. Manuel Sánchez Moreno y Dra. Clotilde Marín Sánchez

Garantizamos

al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 06 de Marzo de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Manuel Sánchez Moreno

Fdo.: Silvia Stefania Longoni

Fdo.: Clotilde Marín Sánchez

“La única lucha que se pierde es la que se abandona”

Ernesto Guevara de la Serna

Medico y revolucionario argentino

Índice

Índice

1. Summary/Resumen	17
2. Objetivos	25
3. Introducción	29
3.1 Clasificación, Morfología y Biología	34
3.1.1 Clasificación	34
3.1.2 Morfología y Biología	36
3.2 Epidemiología	40
3.2.1 Europa	42
3.2.2 Latinoamérica	46
3.3 Manifestaciones clínicas y patológicas	50
3.4 Diagnostico	52
3.4.1 Técnicas convencionales y serológicas	53
3.4.2 Técnicas moleculares	57
3.5 Profilaxis, tratamientos y vacuna	58
3.6 Interacción hospedador-parásito	61
3.6.1 Toxicidad de los radicales libre en <i>Leishmania</i> spp.	66
3.6.2 La Superóxido Dismutasa y la defensa contra los radicales libres de <i>Leishmania</i> spp.	69
3.7 Aislamiento y Purificación de la Fe-SODe	71
4. Materiales y Métodos	75
4.1 Cultivo celular	75

4.2 Preparación de la fracción H	76
4.3 Obtención y Purificación de la Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODe)	77
4.4 Determinación de la concentración de proteínas	79
4.5 Cuantificación de la Actividad Enzimática	80
4.5.1 Cuantificación de la Actividad Enzimática Especifica	80
4.6 Determinación del Peso Molecular (PM)	81
4.7 Determinación del Punto Isoeléctrico (pI)	82
4.8 Anticuerpos policlonales de ratones	83
4.9 Titulación de la Fe-SODe purificada de <i>L. (L.) infantum</i> y <i>L.(V.) peruviana</i>	85
4.10 ELISA	85
4.11 Western blot	87
4.12 IFI	89
4.13 Sueros	89
4.13.1 Sueros humanos	89
4.13.1.a Sueros procedentes de Perú	89
4.13.1.b Sueros procedentes de Colombia	90
4.13.1.c Sueros procedentes de México	90
4.13.1.d Sueros procedentes de Chile	91
4.13.1.e Sueros controles negativos	91
4.13.2 Sueros caninos	91

4.13.2.a Sueros procedente de España	91
4.13.2.b Sueros procedente de Italia	92
4.13.2.c Sueros controles negativos	92
5. Resultados	95
6. Discusión	123
7. Conclusions/Conclusiones	145
8. Bibliografía	149
9. Agradecimientos	185

Summary/ Resumen

1. Summary

Leishmaniasis is an infective diseases caused by parasites belonging to genus *Leishmania*; more than 20 *Leishmania* species are pathogenic for humans.

In 2010 World Health Organization (WHO) confirmed that Leishmaniasis are still one of the most neglected tropical diseases, endemic in 98 countries or territories, most of them developing countries. WHO asserts that 12 million individuals are infected, 350 million are at risk to contract the disease and every year 2 million of new cases are reported. These diseases are a serious public health problem since they are psychologically, socio-culturally and economically expensive. However, those data are not real, since in only 33 countries is compulsory to report new cases of infection, thus a lot of them thus a lot of new cases are may have not been reported.

Leishmaniasis are considered emergent diseases, due to climatic changes, population migrations, invertebrate vector resistance to insecticides, difficulties in the eradication of the infection in the reservoir and co-infection with HIV virus in humans.

Leishmaniasis are “developing countries” typical diseases, characterized by rural transmission, localized in remote areas in the urban

hood, where socio-economical and sanitarian conditions are poor and the diseases are not diagnosed due to lack of medical tools.

Clinical diagnosis of this disease is very complicate; they present a wide range of clinical manifestations, sometimes not-specific, thus the epidemiological study and diagnosis need specific molecular markers for each *Leishmania* species. So far, different antigenic fractions have been studied, but no one has reached the goal.

Superoxide Dismutase (SODs) are a group of antioxidant metal-enzymes, responsible for the dismutation of Superoxide Ion (O_2^-) into Hydrogen Peroxide and Molecular Oxygen.

Until now, all protozoa have showed Iron-SOD activity, and it is considerate an important virulence factor, allowing the parasites to survive against macrophages oxidant defense and to proliferate within them.

SOD activity have been detected in at least one life cycle stage, in *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolityca*, *Acanthamoeba castellani*, *Toxoplasma gondii* and *Trichomonas* spp.. SOD activity have been also showed in parasites belonging to *Trypanosomatidæ* family as, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Phytomonas* spp..

The main goal of the PhD project developed in the present doctoral theses, is the purification of an Iron-SOD excreted by four *Leishmania*

species, and its use in the diagnosis, applying Western blot and ELISA techniques; to the purpose of developing a more sensitive, specific, effective and low cost diagnostic test.

1. Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa protozoaria ocasionada por parásitos del género *Leishmania* existiendo más de 20 especies patógenas para el hombre.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010 reconoció que la leishmaniasis sigue todavía siendo una de las enfermedades tropicales más olvidadas y valoró que es endémica en 98 países, la mayoría en vía de desarrollo. Según las estimaciones de la OMS hay más de 12 millones de personas infectadas, 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y cada año se registran aproximadamente dos millones de nuevos casos. Esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública debido a sus grandes costes a nivel psicológico, socio-cultural y económico. Sin embargo, estos datos no son reales porque sólo en 33 países la denuncia de la enfermedad es obligatoria por lo que la mayoría de los casos no son registrados.

La leishmaniasis se considera una enfermedad emergente dado el aumento del número de enfermos debido a las modificaciones climáticas, a las migraciones de las poblaciones, a la resistencia de los flebotominos a los insecticidas, a la dificultad para eliminar la infección en los animales reservorios y a la co-infección con el virus del VIH.

La leishmaniasis es una enfermedad típica de los países en vía de desarrollo de transmisión rural, localizada en las áreas remotas de los suburbios urbanos donde hay escasas condiciones sanitarias y socio-económicas y donde tampoco se diagnostica la enfermedad por falta de atención médica y recursos sanitarios.

El diagnóstico de esta enfermedad es complicado debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas, a menudo inespecíficas, que puede mostrar la enfermedad, por lo tanto el estudio y diagnóstico epidemiológico requieren un marcador eficaz para cada especie y cepa de *Leishmania*. Hasta el día de hoy muchas fracciones antigénicas han sido propuestas pero ninguna alcanza estos requisitos.

Las Superóxido Dismutasas (SODs) constituyen un grupo de metaloenzimas antioxidantes encargadas de eliminar del medio el ion superóxido (O_2^-) por su dismutación en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La totalidad de los protozoos parásitos investigados hasta la fecha han demostrado poseer actividad SOD ligada a hierro,

considerándose un factor de virulencia, al permitir a los parásitos sobrevivir a la ofensiva oxidante puesta en marcha por el hospedador y así establecerse en él. La actividad de la SOD ha sido detectada en *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba castellani*, *Toxoplasma gondii* y *Trichomonas* spp., en al menos un estadio de su ciclo de vida. Del mismo modo, estudios llevados a cabo con parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatia han corroborado la presencia de al menos dos actividades SOD, como sucede en los casos de *T. cruzi*, *T. brucei* o *Phytomonas* spp..

El proyecto de investigación que se lleva a cabo en esta tesis doctoral tiene como objetivo principal la purificación de una proteína: Superóxido Dismutasa excretada por 4 especies de *Leishmania* y su uso en el diagnóstico, tanto por Western blot como por ELISA. Diseñando, de esta manera, un diagnóstico, rápido, eficaz, específico, sensible y de bajo coste.

Objetivos

2. Objetivos

La leishmaniasis es una enfermedad cosmopolita y grave que cursa con un amplio espectro de manifestaciones clínicas según la especie infectante. Estas afecciones, si no son adecuadamente tratadas pueden causar lesiones desfigurantes en el área oro-faríngea y en otros casos llevar a la muerte. Además la cura de esta enfermedad está estrechamente ligada con su diagnóstico temprano y certero. Sin embargo, hasta el día de hoy, no existe una prueba diagnóstica rápida, económica y fiable, no sólo capaz de detectar la enfermedad sino también de diferenciar entre las diferentes especies del parásito.

Por todo lo anteriormente dicho, el objetivo principal de esta memoria es la búsqueda de una nueva fracción antigénica que muestre una alta sensibilidad y especificidad y la elaboración de una herramienta molecular capaz de identificar y diagnosticar con certeza las diferentes especies de *Leishmania*, así como permitir entender mejor la interacción parásito hospedador para abrir nuevas vías de lucha frente a estos protozoos parásitos

Los principales puntos de estudio de la investigación planteada para conseguir el objetivo principal descrito anteriormente, son

1. Demostrar la presencia de la isoforma excretada de la Hierro Superóxido Dismutasa (Fe-SODe) en *Leishmania (Leishmania) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* y *L. (V.) peruviana*
2. Purificar por medio de una cromatografía de intercambio iónico y una cromatografía de filtración por peso molecular, la Fe-SODe de *Leishmania (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis*.
3. Determinar el punto isoelectrico y peso molecular de las proteínas purificadas.
4. Determinar la alta sensibilidad y especificidad de las Fe-SODe purificadas empleándolas como antígeno en los tests de ELISA y Western-blot ensayando un total de 542 sueros, 155 de perros y 387 de humanos.
5. Comparar los resultados obtenidos empleando como antígeno la Fe-SODe purificada y los resultados obtenidos empleando como antígeno la misma enzima no purificada y el lisado soluble total de los parásitos.

Introducción

3. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por protozoos parásitos del género *Leishmania*, existiendo más de 20 especies patógenas para el hombre. Puede causar diferentes manifestaciones clínicas que son clasificadas en tres grandes grupos, leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea; debidas respectivamente a la replicación de los parásitos en el sistema fagocítico mononuclear, en la dermis y en los tejidos nasofaríngeos. Estos parásitos están ampliamente distribuidos en el Mundo y en el año 2001 la Organización Mundial de la Salud en el programa Tropical Disease Research (WHO/TDR) reconoció esta enfermedad como un problema de salud global, considerándola, junto con malaria, schistosomiasis, filariasis, lepra y tripanosomiasis, una de las seis enfermedades tropicales más importantes [WHO, 2009]. Las lesiones cutáneas producidas por *Leishmania* spp. en humanos han sido descritas desde la antigüedad (668-626 a.C.). En el Nuevo Mundo, las lesiones desfigurantes que afectaban a las poblaciones andinas aparecen en varias esculturas de la época precolombina. Figuras antropomórficas procedentes de las culturas Mochica (330 a.C. – 500 d.C.) y Chimú (1000 - 1400 d.C.) muestran deformaciones faciales típicas de esta enfermedad [Altamiro Enciso, 2000].

Parece estar descrita también en el Viejo Testamento, Éxodo (9 y 10); donde se relata que primero Dios incrementó la gravedad de la “enfermedad de las burbujas” para los Egipcios y luego les mando esta enfermedad como plaga para matarlos [Oumeish, 1999]. Las mismas “burbujas” descrita en el Viejo Testamento habían sido reportadas previamente en el 2000 a.C. en un papiro faraónico con el nombre de “Nile Pimple” [Maspero, 1910]. En el 930 y 970 d.C. en la región de Balkh (Afganistán) y en la de Bagdad (Irak) una enfermedad llamada “Balkh sore” endémica en esta área fue descrita por primera vez. En el siglo XV, la enfermedad anteriormente descrita en las regiones afganas e iraquíes empiezan a difundirse en el Oriente Medio y en el 1830 d.C. aparece por primera vez en Irán con el nombre de “Armenian Boil” y diez años después llega a la capital Teherán [Oumeish, 1999].

En América del sur el primer caso clínico descrito aparece durante la colonización española en un texto de aquel periodo (Fernando de Oviedo, 1535; Pedro Pizarro, 1571 y Fernando de Santillán, 1572) en los que comentan las úlceras dérmicas, llamadas como “enfermedad del valle” o “enfermedad andina” padecidas por los campesinos que volvían de los Andes. En el siglo XVIII, Cosme Bueno e Hipólito Ruiz describieron por primera vez el papel desempeñado por los insectos en la transmisión de la enfermedad. Estos autores describen una “úlceras corrosiva” de difícil curación llamada “uta” que aparecía en la cara [Sánchez-Saldaña et al.,

2004]. En el 1756 d.C. Alexander Russel, describió magistralmente las formas clínicas de la leishmaniasis cutánea en las llamativas cicatrices de un paciente Turco, llamando esta enfermedad “Aleppo Boil”.

A lo largo de la historia la leishmaniasis ha recibido diferentes nombres: Jericho Button (Botón de Jerico), Delhi Boil, Salek, Uta y “AL OKHT” (pequeña hermana) [Oumeish, 1999]. Solo en 1901 se empieza a denominar esta enfermedad como leishmaniasis, cuando William Boog Leishman identificó organismos ovoides extraídos del bazo de un soldado irlandés que había muerto por altas fiebres llamadas “Dum Dum” (Nombre de una ciudad cerca de Calcuta, considerada hasta aquel momento insalubre). Estos organismos fueron en un primer momento descritos como tripanosomas y sólo dos años más tarde Charles Donovan (1903) confirmó el descubrimiento de Leishman identificando los patógenos como organismos diferentes a trypanosomas nombrándolos como *Leishmania donovani*. El primer cultivo de promastigotas de *Leishmania* fue posible en el 1904 cuando Leonard Rogers después de haber incubado un trozo de bazo en medio de cultivo observó que los microorganismos, previamente presentes en el bazo, habían cambiado de morfología, desde circulares a alargados. Esta fue la primera vez que se observaron promastigotas de *Leishmania*. con un microscopio óptico [Gibson, 1983]. En el 1908 los parásitos fueron cultivados en agar sangre y en un medio NNN (Nicolle, Navy and McNeal) modificado [Nicolle, 1908]. En el 1911 Wenyon

propuso que los vectores de estos parásitos eran pequeños mosquitos (flebotominos). Sólo en el 1921 los hermanos Sergent confirmaron esta hipótesis, demostrando que en la zona de la picadura se iban desarrollando úlceras en los voluntarios que se prestaron al experimento [Oumeish, 1999].

En el 2010 la WHO ha estimado que alrededor de 12 millones de personas están infectadas mundialmente, 350 millones están en riesgo de contraer la enfermedad, y que hay dos millones de nuevas infecciones cada año (0.5 millón de leishmaniasis visceral y 1.5 millón de leishmaniasis cutánea). La leishmaniasis es endémica en 98 países o territorios en todo el Mundo, excepto los continentes Oceanía y Antártida en los que la leishmaniasis nunca se ha registrado en humano [WHO, 2010].

Se estima que la leishmaniasis visceral (LV) causa más de 50 mil muertes cada año, una tasa superada sólo por la malaria entre las enfermedades parasitarias. Sin embargo, la mayoría de los casos no son reportados, debido a que la denuncia de la enfermedad es obligatoria sólo en 33 países. En los últimos años, la leishmaniasis ha sido considerada como una enfermedad emergente, observándose un incremento del número de los pacientes, debido a cambios climáticos, a migraciones de las poblaciones, a la resistencias de los flebotominos a los insecticidas, a las

dificultades de eliminación de la infección en los animales que actúan como reservorios y a la co-infección con el HIV en humanos.

Se estima que en el estado de Bihar en la India, 250 mil personas han contraído la LV desde 1993 hasta 2002 mientras que en el sur del Sudán, desde 1998 hasta 2003 unas 100 mil personas han muerto (59 mil sólo en el 2001) [Davies et al., 2003; Catania et al., 2003].

En los países de clima templado la LV está localizada en la cuenca del Mediterráneo (España, Italia, Grecia, Francia, Croacia, Serbia, Montenegro, Portugal, Turquía y Macedonia) pero es muy raro encontrar personas que padezcan esta enfermedad y los pocos casos que se reportan cursan en niños o son caso de co-infección con HIV [Davies et al., 2003; Catania et al., 2003].

Esta es una enfermedad típica de países en vía de desarrollo donde las condiciones sanitarias y socioeconómicas son muy bajas y, por lo tanto, no hay un buen servicio de diagnóstico de la enfermedad o hay una gran falta de atención médica. En la India el 88% de las personas que han contraído esta enfermedad ganan menos de 2\$ al día [WHO, 2010].

3.1. Clasificación, Morfología y Biología

3.1.1 Clasificación

La clasificación de *Leishmania* spp. ha sido basada, en un principio, según criterios etiológicos como el vector, la distribución geográfica, el tropismo, las propiedades antigénicas y las manifestaciones clínicas; por ejemplo *Leishmania (Viannia) guyanensis*, aislada en Guyana; *Leishmania (V.) peruviana* aislada en Perú; o *Leishmania (L.) infantum* que toma el nombre del paciente donde se aisló por primera vez, un niño en Túnez (del latín *infans* = bebé). Esto se debió al hecho de que morfológicamente es imposible distinguir las diferentes especies. Sin embargo, los análisis bioquímicos y moleculares han demostrado que los criterios patológicos y geográficos muchas veces son inadecuados. Otros criterios, como los patrones polimórfico de los marcadores de DNA del kinetoplasto (DNAk), las proteínas o antígenos, muchos más específicos, han sido usados para clasificar los componentes del género *Leishmania* [Bañuls et al., 2007]. Nuevos métodos para la detección, el aislamiento y la identificación genética han sido empleados para identificar un gran número de especies hasta ahora descritas. Actualmente se conocen 30 especies de *Leishmania* de las cuales 20 son patógenas para el hombre.

Según la clasificación taxonómica actual *Leishmania* spp. pertenece al subreino Protozoa, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y genero *Leishmania* que a su vez está dividida en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, que se separaron de acuerdo a su localización en el intestino del vector [Lainson et al., 1988]. El subgénero *Leishmania* incluye cinco complejos: Donovanian complex, Tropica complex, Major complex; Aethiopia complex y Mexicana complex. El subgénero *Viannia*, incluye dos complejos: Brazilian complex y Guayanian complex. En el subgénero *Viannia* están presentes también *L. (V.) laisoni* y *L. (V.) colombiensis* las que todavía no han sido asignadas a ningún complejo. Además, están presentes otras especies, que no pertenecen a ningún complejo, que son o no patógenas para el hombre o que por lo menos, hasta la fecha no se han reportado casos en humanos [WHO; 2010].

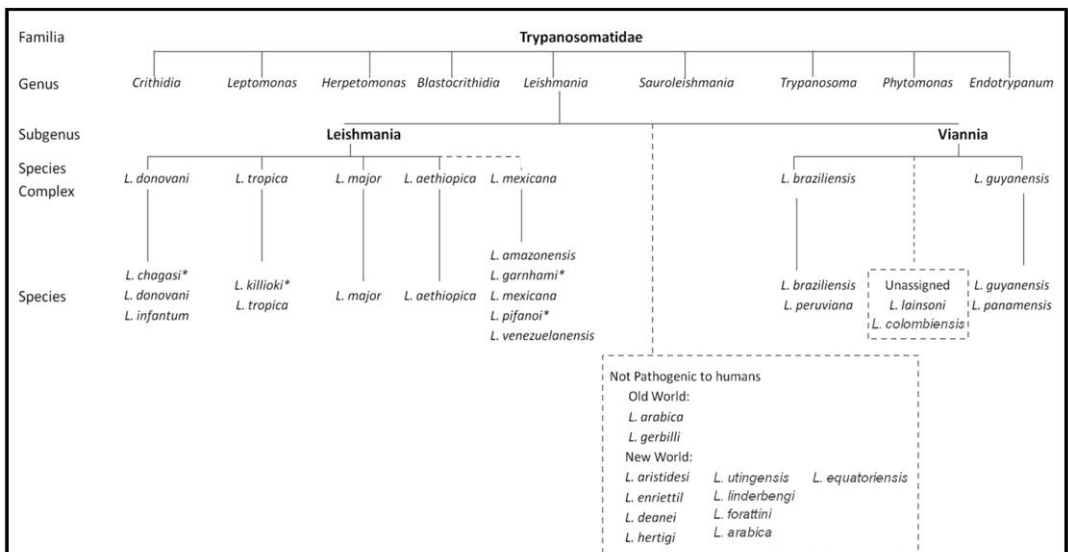


Figura 1. Taxonomía de *Leishmania* spp. Esquema basado en el esquema y las informaciones publicadas en el "Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases", WHO; 2010

3.1.2 Morfología y Biología

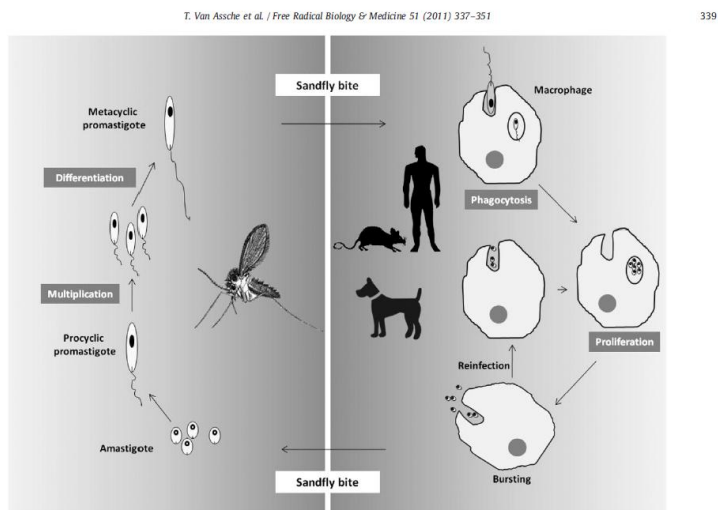
Leishmania es un parásito heteroxeno que, durante su ciclo de vida presenta dos formas morfológicas adaptadas a diferentes entornos en los que tiene que sobrevivir: un forma extracelular y otra intracelular [Trager; 1953]. La forma extracelular libre, llamada promastigota, se desarrolla en el tracto digestivo del vector flebotomino, el hospedador invertebrado, y es la forma infectiva para el hospedador vertebrado. Es de forma alargada entre 15 y 20 μm de longitud y presenta un flagelo libre en su parte anterior que puede llegar a medir el doble del cuerpo del mismo parásito. La microscopía electrónica ha revelado un núcleo central, ribosomas, el retículo endoplasmático, el aparato del Golgi, una única mitocondria y un kinetoplasto que aparece como un cuerpo electrodense en la parte anterior [Crowther et al., 1954; Lofgren, 1950].

La forma intracelular llamada amastigota, es una forma aflagelada que se encuentra generalmente en el interior de las células del sistema mononuclear (macrófagos) de los tejidos parasitados de los hospedadores vertebrados. Las formas amastigotas suelen estar rodeadas por una vacuola (vacuola parasitófora) que se forma después de la fusión del lisosoma y el fagosoma, una vez que el parásito ha sido fagocitado [Chang et al., 1978]. Las amastigotas presentan una forma ovoide midiendo entre 2 y 5 μm de

diámetro, con un núcleo central y un kinetoplasto alargado, un saco flagelar y un vestigio del flagelo [Magill, 2000; Chang et al., 1978].

El vector de estos parásitos es un mosquito “Sand fly o mosca de la arena”, de pequeño tamaño y perteneciente a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotiminae que miden entre 2 y 3.5 mm de longitud y con un color amarillo/marrón, con alas lanceoladas y el cuerpo entero está recubierto por finos pelos.

Hay más de mil especies pertenecientes a la familia Phlebotominae en todo el mundo y se ha estimado que son setenta los vectores de las especies de *Leishmania*. En el Viejo Mundo está presente el género *Phlebotomus* mientras que en el Nuevo Mundo está presente el género *Lutzomya*. Solamente las hembras de estos dípteros son hematófagas en cuanto sólo ellas necesitan una ingesta de sangre para poder concluir su ciclo reproductivo [Murray et al., 2005].



Durante el desarrollo en el interior del hospedador invertebrado el parásito adopta diferentes morfologías intermediarias entre la forma flagelada y la aflagelada. Cuando el flebotomo se alimenta de sangre de un individuo infectado, el desarrollo del parásito empieza en el aparato digestivo. Durante un periodo inicial de 6-9 meses (dependiendo de la especie) la *Leishmania spp.* se va diversificando en los diferentes estadios hasta llegar a la forma promastigota metacíclica. El proceso de transformación de la forma amastigota en promastigota metacíclica es conocido como metacicloogénesis [Sharma et al., 2008; Kamhawi, 2006]

Aproximadamente, a partir del séptimo día de la ingesta aparecen las primeras formas infectivas y las formas promastigotas metacíclicas son liberadas después de producirse un cambio de carga en los azúcares de la superficies epitelial del intestino del insecto [Cunningham, 2002; Chang et al., 1990]. Las formas promastigotas metacíclicas son transmitidas al hospedador vertebrado a través de la picadura del flebotomino. Una vez en el interior del hospedador vertebrado, el parásito tiene la capacidad de evadir la defensa del hospedador y además, de obtener beneficios de ellas. Las formas promastigotas son capaces de resistir a la lisis debido a la gran cantidad de lipofosfoglicanos (LPG) presentes en sus membranas (más de un millón de copias por células). A esto, se le suma el hecho que estas moléculas permiten la adhesión de los receptores de la membrana de los

macrófagos, como el CR3, facilitando la fagocitosis del parásito [Cruz et al., 2006].

Los monocitos parasitados que circulan en el torrente sanguíneo son ingeridos por otro flebotomino; en el intestino de este las formas amastigotas son liberadas y comienzan de nuevo el ciclo de transformación a promastigotas metacíclicas. Después de varios días, *Leishmania* spp. alcanzan otra vez la forma infectiva, cerca de la probóscide del flebotomino, permaneciendo allí, y listos para ser inoculados en un huésped vertebrado completando así el ciclo.

La infección por *Leishmania* spp. puede producirse sin la participación del vector. La forma visceral puede ser transmitida directamente por transfusión sanguínea o trasplante de órgano y congénitamente de madre a hijo. La forma cutánea, por otro lado puede ser transmitida a través de intercambio de agujas o de jeringas entre drogadictos [WHO, 2010; Murray et al., 2005].

La leishmaniasis es una enfermedad típicamente antropozoonótica. La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis rurales o periurbanas, con excepción de la única forma de leishmaniasis antroponótica urbana causada por *L. (L.) tropica* presente en el Viejo Mundo.

3.2 Epidemiología

La epidemiología de las leishmaniasis depende de la especie, de las características ecológicas de las áreas de transmisión, del nivel de exposición de la población al parásito y de manera muy especial al comportamiento humano [WHO, 2010].

La leishmaniasis, tanto cutánea como visceral ha sido reportada en Europa, Asia, África y América. El 90% de los casos de leishmaniasis cutáneas ocurren en Irán, Afganistán, Siria, Arabia Saudí, Brasil y Perú. Mas del 90% de los casos de leishmaniasis visceral ocurren en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudan. El 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea son reportados en Bolivia, Brasil y Perú. En años anteriores, los casos de leishmaniasis se han mantenido constantes y estables, pero actualmente el riesgo de contraer la enfermedad ha cambiado [WHO, 2010; Murray et al., 2005]. Los factores que han incrementado la incidencia de la enfermedad son causados sobre todo por los mismos hombres, por ejemplo, la migración, la deforestación, la urbanización masiva, el desarrollo y explotación de la agricultura y los cambios en la susceptibilidad del hospedador vertebrado a infectarse debido a malnutrición y especialmente al incremento de las inmunodepresiones. Las co-infecciones con VIH han sido reportadas en 35 países, la mayor prevalencia de co-infección *Leishmania*-HIV se registra en el área del

Mediterráneo con más de 2.000 casos de los cuales el 90% han sido reportados en España, Francia, Italia y Portugal. De toda forma, se considera que la co-infección leishmaniasis visceral-HIV en los países del sur de Europa no es tan alta como en otros países debido a las buenas terapias anti-retrovirales (HAART). Globalmente la incidencia de la co-infección es subestimada y está destinada a incrementar drásticamente [WHO, 2010; 2007; Murray et al., 2005; Laison et al., 1987].

Podemos observar diferentes ciclos epidemiológicos: (1) un ciclo primitivo o selvático (la infección en humano es accidental y la transmisión ocurre en el foco salvaje), por ejemplo: *L. (V.) braziliensis*; (2) un ciclo secundario o peridoméstico (el reservorio es un animal doméstico o peridoméstico, y el parásito es transmitido al hombre a través de un flebótomo antroponótico), por ejemplo: *L. (L.) infantum*; (3) un ciclo terciario, estrictamente antroponótico en el que el animal reservorio desaparece (o no se ha identificado todavía) y el vector flebotomo es totalmente antroponótico, por ejemplo: *L. (L.) tropica* [WHO, 2010].

Leishmania spp. son parásitos capaces de infectar a una gran variedad de órdenes de mamíferos que son potenciales reservorios: roedores, cánidos, marsupiales, ungulados primitivos y primates. Los humanos son posibles hospedadores pero en la mayoría de los casos son hospedadores accidentales, especialmente turistas y más frecuentemente militares y trabajadores que entran en el hábitat salvaje de los parásitos. El

único hospedador vertebrado conocido es el perro en lo que respecta a *L. (L.) infantum* mientras que todas las otras infecciones en perros, causadas por diferentes especies de *Leishmania*, siguen siendo consideradas accidentales [WHO, 2010].

Además de la forma natural de transmisión y por uso de jeringas infectadas entre drogadictos, la leishmaniasis puede ser transmitida por transfusión sanguínea y congénitamente desde la madre a hijo, sin embargo estas dos formas de transmisión son menos frecuentes. El rango de edad que mayormente es infectado depende de la especie de *Leishmania*. Por ejemplo en focos endémicos para *L. (L.) infantum* los pacientes suelen ser jóvenes (< de 5 años) mientras que en focos endémicos para *L. (L.) donovani* la edad media aumenta alcanzando un rango entre los 13 y los 23 años [WHO, 2010].

3.2.1 Europa

L. (L.) infantum es originaria del Viejo Mundo y es endémica en todos los países de la cuenca del Mediterráneo representando un gran problema veterinario debido a que los perros son los más importantes reservorios y también el hospedador vertebrado definitivo de esta especie de *Leishmania* [WHO, 2010].

España es considerada como un país endémico y la prevalencia de la leishmaniasis canina varía entre un 3.7% y un 44.2%. La prevalencia más baja se encontró en el área de los Pirineos y en el norte del país mientras que la prevalencia más alta ha sido registrada en las costas del Mediterráneo especialmente en el sur [Miró et al., 2012; Chitimia et al., 2011; Cabezón et al., 2010; Millán et al., 2010; Acedo Sánchez et al., 1996]. Los casos en humanos son raros y están relacionados con el uso compartido de jeringas entre drogadictos. Se ha demostrado que cambios climáticos pueden variar la incidencia de la enfermedad como ocurrió en el área de Leganés (Madrid) donde se construyó un nuevo parque periurbano entre el 2005 y el 2011. En esta área los casos de leishmaniasis humana pasaron de 3 cada cien mil habitante en el 2009 a los 55.7 casos en el 2011 [Molina et al., 2012].

L. (L.) infantum está presente también en otros países europeos como: Portugal, Italia, Francia y Grecia, consideradas áreas endémicas con una prevalencia muy parecida a la encontrada en España. En los últimos años se han reportado casos de leishmaniasis humana también en países no endémicos como Austria, Alemania, Suiza y Reino Unido [Hunziker et al., 2012; Wall et al., 2012; Poepl et al., 2011; Harms et al., 2011]. Con menor frecuencia respecto a las leishmaniasis humanas también se han reportado casos de leishmaniasis felina y canina [Naucke et al., 2012; Shaw et al., 2008; Rüfenacht et al., 2005]. Todos los casos clínicos, tanto

en humanos como en otros animales reportados en estos países no endémicos, habían sido importados desde áreas endémicas en las que la infección ocurrió.

Las infecciones adquiridas en las regiones del Mediterráneo se suelen quedar usualmente asintomáticas o de curación espontánea en adultos sanos mientras que progresan de una forma muy grave en niños y en individuos inmunodeprimidos [Peoppl et al., 2012]. Un dato alarmante para la comunidad sanitaria es la presencia desde hace unos años de los vectores flebotomíneos en áreas hasta ahora consideradas no endémicas y libres de *Leishmania* spp. [Miró et al., 2012]

OLD WORLD					
COUNTRY	PHATOLOGY	SPECIES	COUNTRY	PHATOLOGY	SPECIES
Albania	Cutaneous leishmaniasis	Unkown	Mali	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. major</i>
Algeria	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i>	Malta	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i>
Burkina Faso	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown	Mauritania	Cutaneous leishmaniasis	Unkown
Cameroon	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown	Morocco	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i>
Central African Republic	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i>	Namibia	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. aethiopica</i> <i>L. tropica</i>
Chad	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown	Niger	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. major</i>
Cyprus	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. donovani</i>	Nigeria	Cutaneous leishmaniasis	Unkown
Democratic Republic of congo	Visceral leishmaniasis Unspecified leishmaniasis	Unkown	Portugal	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i>
Egypt	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i>	Senegal	Visceral leishmaniasis (no in human) Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i>
Ethiopia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. aethiopica</i>	Serbia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown
France	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i>	Somalia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown
Gambia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown	Spain	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i>
Greece	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i>	Sudan	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i>
Israel	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i>	Syrian Arab Republic	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i>
Italy	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i>	Togo	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Unspecified leishmaniasis	Unkown
Jordan	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. major</i>	Tunisia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. killicki</i>
Kenya	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. aethiopica</i>	Turkey	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i>
Lebanon	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	Uganda	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	Unkown
Lybian Arab Jamahiriya	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. major</i>	West bank and Gaza strip	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. infantum</i>

Elaborado a partir del Report de la OMS del 2010 [WHO, 2010]

3.2.2 Latinoamérica

En América Latina casi 50 millones de personas viven en pobreza extrema (ganando menos de 1\$ por día), representando el 8.6% de la población de esta región; y cerca de 127 millones (22% de la población) viven por debajo de la línea de la pobreza (ganando menos de 2\$ por día) [WHO, 2010]. La mayoría de estas personas viven en condiciones sanitarias que favorecen la aparición de muchas enfermedades, la mayoría de las cuales son olvidadas para la sociedad desarrollada o por varias razones no reciben la atención debida por parte de las autoridades sanitarias.

La leishmaniasis en el Nuevo Mundo actualmente está distribuida desde el sur de Texas (USA) hasta Argentina, excluyendo Chile, Uruguay e Islas Caribeñas [WHO, 2010].

El primer caso de leishmaniasis cutánea en América Latina fue descrito en 1909 por Lindenberg que lo identificó como una nueva especie de *Leishmania* y la nombró *Leishmania (V.) braziliensis*. [Ramírez et al., 1997] El primer caso parasitológicamente confirmado en Colombia fue reportado en 1929. En Perú y en Chile fue reportado en 1908, en Costa Rica en 1914 y en la Península de Yucatán (México) en el 1933. Actualmente en México se han reportado casos de leishmaniasis en 20 estados de los que sólo 7 son considerados endémicos: Campeche,

Chiapas, Yucatán, Quintana Roo, Oaxaca, Tabasco y Veracruz [Sanchez-Garcia et al., 2010; Velasco Castrejon et al., 2009; Cordova-Uscanga et al., 1993].

En Perú, la leishmaniasis constituye la tercera causa de muerte por infecciones trasmisibles después de la malaria y la tuberculosis, considerándose una enfermedad parasitaria de continua expansión. Mientras que en 1999 se observaron 4.645 casos, en 2002 se registraron 5.998 casos de leishmaniasis cutánea y 380 de muco-cutánea. [Cáceres et al., 2002]. La leishmaniasis es endémica en los valles interandinos, así como en el llano amazónico del Perú.

En América Latina, en un mismo país, hay más de una especie de *Leishmania* endémica.

En Perú coexisten 6 especies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) colombiensis* y *L. (V.) guayanensis* a pesar de que, de esta última no se hayan encontrado infecciones en humanos. Estas seis especies, aunque en un principio presenten la misma manifestación cutánea, pueden evolucionar a manifestaciones subclínicas de tipo: mucocutaneas (principalmente causada por *L. (V.) braziliensis* y ocasionalmente por *L. (V.) guayanensis* y *L. (V.) panamensis*) y cutánea difusa (causada por *L. (L.) amazonensis*). *Leishmania (V.) peruviana* suele curarse espontáneamente teniendo por lo tanto una evolución benigna [WHO, 2010].

En Colombia, son endémicas siete especies de *Leishmania*: *L. (L.) infantum* (syn. *chagasi*), *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) panamensis*, todas con manifestaciones clínicas cutáneas excepto *L. (L.) infantum* (syn. *chagasi*) que presenta una patología visceral [WHO, 2010].

En México se han registrado hasta el día de hoy sólo tres especies de *Leishmania*, *L. (V.) braziliensis*, *L. mexicana* y *L. infantum* (syn. *chagasi*) [WHO, 2010].

Sin embargo la presencia de una u otra especie de *Leishmania* y la coexistencia de más de una especie en la misma área puede ser debido a movimientos migratorios de poblaciones humanas y de los hospedadores, tanto vertebrados como invertebrados.

NEW WORLD					
COUNTRY	PHATOLOGY	SPECIES	COUNTRY	PHATOLOGY	SPECIES
Argentina	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> <i>L. chagasi</i>	Guayana	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. guyanensis</i>
Belize	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i>	Honduras	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. chagasi</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. mexicana</i>
Bolivia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. chagasi</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. lainsoni</i>	Martinique	Cutaneous leishmaniasis	<i>Unknown</i>
Brazil	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. chagasi</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. guanaensis</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. shawi</i> <i>L. forattinii</i> <i>L. deanei</i> <i>L. enrietti</i>	Mexico	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. chagasi</i>
Colombia	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. chagasi</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. panamensis</i>	Nicaragua	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. chagasi</i>
Costa Rica	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. chagasi</i>	Panama	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. aristidesi</i> <i>L. hertigi</i>
Dominican Republic	Cutaneous leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> complex	Paraguay	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. chagasi</i>
Ecuador	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. panamensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. equatoriensis</i>	Peru	Cutaneous leishmaniasis Mucosal leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. peruviana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. guayanaensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. colombiensis</i>
El Salvador	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. mexicana</i> <i>L. chagasi</i>	Suriname	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. guyanensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i>
French guayana	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. guayanaensis</i> <i>L. naiffi</i>	Trinidad and Tobago	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. mexicana</i>
Guadaloupe	Cutaneous leishmaniasis	<i>L. chagasi</i>	United States of America	Visceral leishmaniasis (no human) Cutaneous leishmaniasis	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i>
Guatemala	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis	<i>L. mexicana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. chagasi</i>	Venezuela	Visceral leishmaniasis Cutaneous leishmaniasis Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. difanoi</i> <i>L. gamhiani</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. colombiensis</i>

Elaborado a partir del Report de la OMS del 2010 [WHO, 2010]

3.3 Manifestaciones clínicas y patología

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: cutánea, cutánea difusa, mucocutánea y visceral. Todas estas formas empiezan siempre con la picadura de un mosquito flebotomino que inyecta las formas promastigotas metacíclicas [Cáceres et al., 2002]. Las formas cutáneas (típica del Viejo Mundo) comúnmente se manifiestan con lesiones ulcerosas, aunque la patología es generalmente característica de cada especie de *Leishmania* y normalmente desaparece espontáneamente. La lesión suele aparecer en el sitio de la picadura del flebotomino y con el tiempo, muy raramente, se pueden apreciar lesiones satélites alrededor de la primera lesión. La respuesta inmunológica del hospedador determina el tamaño de crecimiento de las úlceras y el tiempo de la curación espontánea (entre 6 meses y 3 años) [Cáceres et al., 2002]. En casos extremos la lesión cutánea se puede complicar y pueden aparecer múltiples lesiones que no cicatrizan, consideradas recaídas, muy difíciles de tratar, duraderas y destructivas, que pueden producir estigmas para toda la vida. La leishmaniasis cutánea difusa suele aparecer en individuos inmunodeprimidos y su importancia es debida a que las lesiones nunca desaparecen espontáneamente sin tratamiento. Por lo tanto este cuadro clínico es considerado un problema especial de la salud pública.

En algunos casos se presentan lesiones verrugosas similares a la lepra, por esto en algunos países se identifica como “Lepra Blanca”.

La forma mucocutánea causa una destrucción extensiva de las cavidades oro-nasales y faringe provocando desfiguraciones y mutilaciones de la cara, causando una profunda aflicción en los pacientes de por vida.

Las lesiones de la mucosa se suelen producir en una segunda estancia, cuando los parásitos migran desde una lesión primaria (forma cutánea) cerca de la zona de las mucosas. El periodo de incubación en la región muco-nasal no está todavía muy claro, aunque la mayoría de los casos usualmente se desarrollan cinco años después de la curación espontánea de la lesión primaria. Algunas lesiones mucocutáneas se han reportado también veinte o treinta años después de la primera infección [Ministerio de Salud Peruano, 2000].

La LV (formas: mediterránea, china, americana, india y africana, conocida como Kala-azar) es la forma más grave ya que puede llevar a la muerte si no se trata ya que afecta a órganos vitales. Si se trata, después de la recuperación los pacientes pueden desarrollar una forma cutánea crónica llamada “leishmaniasis dérmica post Kala-azar” (PKDL) que generalmente requiere tratamientos largos y muy caros. La PKDL normalmente aparece dos años antes de la completa curación de la infección visceral y aparece como manchas en la piel similares a pecas. Como pasa en las otras manifestaciones clínicas de *Leishmania* spp., también en este caso las diferencias clínicas entre individuos están relacionadas con sus respuestas

inmunes y de la especie de *Leishmania* que los han parasitado [WHO, 2010].

Cómo las especies de *Leishmania* producen enfermedad en humanos y el por qué de el amplio abanico de síntomas clínicos tan diferentes sigue siendo un gran enigma [Cáceres et al., 2002].

3.4 Diagnóstico

Para un diagnóstico certero de la leishmaniasis, en primer lugar hay que considerar los antecedentes, como por ejemplo, el origen del paciente, las residencias previas, la duración de la estancia o visita a áreas endémicas, la presencia de lesiones cutáneas anteriores que podrían ser catalogadas como leishmaniasis, etc. [OGE and INS, 2000].

Después de haber considerado todos estos aspectos, el diagnóstico clínico puede ser un recurso muy útil para definir la especie de *Leishmania*. Al final como confirmación definitiva, se lleva a cabo un análisis de laboratorio.

Es crucial hacer un diagnóstico diferencial con otros agentes patógenos, endémicos en el área de procedencia del paciente, que puedan causar lesiones similares.

El diagnóstico diferencial para la LV incluye, entre otras enfermedades: malaria, síndrome de esplenomegalia tropical,

schistosomiasis, cirrosis con hipertensión de la vena porta, tripanosomiasis africana, tuberculosis miliar, brucelosis, fiebre tifoidea. Es frecuente un oscurecimiento de la piel (Kala Azar en Hindi significa “Fiebre negra”) y en los niños suele causar diarrea y consecuente retraso en el crecimiento [Herwaldt, 1999].

Además, muchas enfermedades dérmicas son con frecuencia erróneamente diagnosticadas como lesiones cutáneas primarias producidas por *Leishmania spp.*; algunas de las enfermedades que podrían ser confundidas por leishmaniasis cutánea son: impétigo, infección de la picadura de cualquier insecto, lepra, lupus vulgaris, pian (yaws), blastomicosis y cáncer de piel [Herwaldt, 1999].

Las lesiones primarias de la leishmaniasis mucocutánea se suelen confundir con paracoccidioidomicosis, reticulosis polimórfica, granulomatosis de Wegner, linfoma, histoplasmosis, pian (yaws), tuberculosis, carcinoma nasofaríngeo y otras lesiones cutáneas [EI-Hassan et al., 2001; Herwaldt, 1999].

3.4.1 Técnicas convencionales y serológicas

La diagnosis definitiva de la leishmaniasis requiere la demostración del parásito, tanto en forma amastigota, en una biopsia de tejido lesionado o aspirado de órgano, así como de promastigotas aisladas en cultivos. La

presencia del parásito puede ser demostrada mediante frotis, cultivo, histopatología y/o con la inoculación en animales de una muestra de tejido aspirada da la medula ósea o del bazo. La sensibilidad de esta técnica es muy elevada cuando se extrae una muestra del bazo, pero es muy complicada ya que se pueden provocar hemorragias. Ocasionalmente, se han encontrado amastigotas también en biopsia de hígado, aspirados de nódulos linfáticos y en frotis de la capa leucoplaquetaria “Buffy-coat”, especialmente en las infecciones Leishmania-HIV [Herwaldt, 1999]. De todas formas, este tipo de diagnóstico es a menudo muy difícil de establecer, especialmente en lesiones crónicas, ya que la sensibilidad es ligeramente mayor en úlceras recientes respecto a las que tienen más de seis meses [Rosbotham et al., 1996]. Además, la observación directa podría conducir a diagnosticar un falso negativo si la muestra que se toma no es representativa o no se realiza una tinción adecuada [Reithinger et al., 2007; Barrouin-Melo et al., 2004].

El diagnóstico serológico se basa en la presencia de una respuesta humoral específica o de una respuesta inmune mediada [Sing et al., 2003].

Las técnicas más utilizadas son el IFI (Inmunofluorescencia indirecta), la ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y el Western-blot.

El IFI es la técnica más utilizada por su rapidez, sencillez y posibilidad de titular ofreciendo un grado relativo de la enfermedad. La

titulación de las muestras ensayadas varía dependiendo de la cepa utilizada pudiendo estar entre 1/80 y 1/120 [Guillén Llera et al., 2002]. El IFI sigue considerándose la técnica estándar a pesar de no ser la más sensible, entre otros requiere de personal técnico muy capacitado y bien entrenado; el 38% de los resultados pueden llegar a ser falsos negativos [Reale et al., 1999].

La ELISA se empezó a utilizar en el diagnóstico de la leishmaniasis en los años 70 y presenta valores de sensibilidad que varían entre el 85% y el 96% y especificidad entre el 86% y el 98%. Sin embargo, la utilización de antígenos específicos de *Leishmania* spp. están contribuyendo a mejorar estos resultados [Braz et al., 2002].

El Western-blot permite identificar visualmente sin necesidad de microscopio o espectrofotómetro la positividad del suero problema. Esta técnica, mucho más sensible que la ELISA, es más utilizada en investigación que en diagnóstico debido a su alto coste [Fernández-Pérez et al., 2003; Lasri et al., 2003; Aisa et al., 1998; Carrera et al., 1996].

La gran variedad de sensibilidad y especificidad de estas dos últimas técnicas serológicas son debidas al tipo de antígeno empleado. Empleando antígeno crudo de *L. (L.) infantum* (*syn. chagasi*) en cánidos, se ha observado una sensibilidad y especificidad muy bajas, 51.5% y 57.5% respectivamente [Vargas, 2005]. Estos límites de especificidad y

sensibilidad son debidos a la presencia de epítomos compartidos con otros parásitos como *T. cruzi* y *Plasmodium* spp. [Montoya et al., 1997].

Muchas investigaciones se están realizando para definir el antígeno específico de *Leishmania* spp., con el fin de incrementar la especificidad del serodiagnóstico. Así, diferentes moléculas se han propuesto: el antígeno k39 por *L. (L.) chagasi* que es usado en el serodiagnóstico de la leishmaniasis visceral, [Badaro et al., 1996; Burns JM et al., 1993], un antígeno de membrana de 32kDa (P32) presente en *L.(L.) donovani* y *L. (L.) infantum*, con una alta sensibilidad y una especificidad del 94% en el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral en el Mediterráneo [Tebourski et al., 1994], dos antígenos hidrofílicos (k9 y k26) de *L. (L.) infantum* (*syn. Chagasi*) [Bhatia et al., 1999], una fosfatasa ácida excretada [Ryan et al., 2002], el antígeno A2 [Carvalho et al., 2002], dos proteínas Thermal-shock (Hsp 70 y 83) [Celeste et al., 2004], una cisteína proteinasa recombinante [de Souza-Dias et al., 2005], tres antígenos recombinantes (rH2A, KMP11 y Protein Q) [Passos et al., 2005], los antígenos rk26 y rK39 de *L. (L.) infantum* usados en ELISAs con resultados de alta sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad en perros que presentaban la sintomatología; mientras que, la proteína rA2 de *L. (L.) donovani* mostró ser mucho más sensible para detectar la enfermedad en perros asintomáticos [Porrozzi et al., 2007]. Se han utilizado también la totalidad de las proteínas excretadas por *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) mexicana* a partir de cultivo de

promastigotas incubadas durante 72 horas en medio sin suero [Romero et al., 2004], un antígeno de 20kDa excretado por amastigotes de *L. (V.) amazonensis* [Hernández-Chinea, 2007] y últimamente se ha empleado una histona (CLH) purificada a partir del extracto total de promastigotas de *L. (L.) infantum (syn chagasi)* que ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad discriminando entre los pacientes enfermos y los controles sanos, obteniendo resultados (97.6% sensibilidad y 100% especificidad) muy parecidos a los mostrados por el antígeno k39 (97.6% sensibilidad y 97.1% especificidad) actualmente recomendado por la OMS para la detección de leishmaniasis visceral [Lakhal et al., 2012; WHO, 2010].

Nuestro grupo ha propuesto como antígeno una Superóxido Dismutasa excretada por *L. (L.) infantum* (SODe) que presenta inmunogenicidad en el diagnóstico de la LV en perros [Marín et al., 2007].

3.4.2 Técnicas moleculares

A pesar de que diferentes métodos moleculares han sido empleados con resultados satisfactorios en el diagnóstico de las leishmaniasis, la PCR (Polymerase Chain Reaction) actualmente constituye la mejor opción tanto para investigadores como para clínicos. La PCR ha mostrado ser altamente sensible, rápida y capaz de actuar sobre un rango muy amplio de especies clínicas [Tavares et al., 2003].

Se han llevado a cabo varios estudios con el fin de comparar las distintas técnicas de diagnóstico existentes, confirmando que la técnica más sensible y específica es la PCR [Saridomichelakis et al., 2005; Ikonopoulou et al., 2003; Piarroux et al., 1994]. Sin embargo, Moreira y colaboradores observaron una excepción en los casos asintomáticos, donde la inmunocitoquímica mostró un 100% de especificidad frente al 95% de la PCR [Moreira et al., 2007].

Sin embargo, el alto coste que presenta esta técnica limita su uso en hospitales y en laboratorios de investigación sobre todo de los países donde la leishmaniasis es endémica, convirtiéndolo en un método inadecuado.

3.5 Profilaxis y tratamiento

Hasta el día de hoy, no existen vacunas o profilaxis específicas y con buenos resultados para la leishmaniasis humana, debido a la gran variabilidad de especies y cepas patógenas y también debido al escaso interés de las casas farmacéuticas.

Durante muchos años se ha intentado inmunizar a los pacientes inoculando formas promastigotas de *L. (L.) major* obtenidas en un cultivo *in vitro*. Sin embargo este procedimiento presenta un alto riesgo, por lo que no se puede usar como un procedimiento normal, solo se puede emplear con voluntarios sanos y un sistema sanitario eficiente [WHO, 2010].

En diferentes países se han propuesto vacunas obtenidas a partir de parásitos enteros muertos o de extractos parasitarios, como es el caso de Colombia, Ecuador, Venezuela, Irán y Sudan, o vacunas obtenidas empelando proteínas recombinante. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron todos negativos, y no generaron una protección efectiva por lo que fueron descartados [Palatnik-de-Sousa et al., 2012; WHO, 2010; Khamesipour et al., 2006].

A día de hoy se han comercializado sólo dos vacunas, ambas para leishmaniasis canina. Una se comercializó en Brasil con el permiso del Ministerio de Agricultura bajo el nombre de Leishmune®, compuesta por el antígeno FML de *L. (L.) donovani* [Palatnik et al., 1989] que demostró ser antigénico tanto para humanos [Palatnik-de-Sousa et al., 1995] como para perros [Borja-Cabrera et al., 1999] a esta fracción antigénica le añadieron como coadyuvante saponina, una fracción altamente purificada de *Quillaja saponaria* (QS21) [Oliveira-Freitas et al., 2006]. Esta vacuna llegó hasta la última fase del estudio en el que mostró una protección entre el 92 y 95% y una eficacia entre el 76 y el 80% [da Silva et al., 2001; 2008]. Obtuvo la licencia definitiva en Octubre 2011 [Palatnik-de-Sousa et al., 2012] pero en la actualidad es comercializada como profilaxis con el nombre de Leishmune® y no como vacuna.

En Europa se está comercializando una vacuna para perros, CaniLeish[®], de la casa farmacéutica Vibrac[™]. La vacuna está compuesta por las proteínas totales excretada por *L. (L) infantum* a las que se le añade como coadyuvante saponina, como en el caso de la vacuna brasileña, para aumentar la respuesta inmunitaria. Los datos de una investigación realizada por un grupo de la Universidad de Nápoles, demostró que la probabilidad de contraer la enfermedad era exactamente la misma tanto en perros vacunados como en no vacunados [Oliva G et al., 2012].

El tratamiento de todas las formas clínicas de la leishmaniasis se realiza con los mismos compuestos: antimoniales pentavalentes, Pentamidinas y Anfotericina B, pero difieren la posología y ruta de administración de acuerdo a cada forma clínica y pronóstico. Los antimoniales pentavalentes están considerados como el grupo de medicamentos de primera elección en el tratamiento de las leishmaniasis desde hace 40 años mientras que la Anfotericina B constituye el medicamento de segunda elección [WHO, 2010].

Los medicamentos existentes para el tratamiento de la leishmaniasis visceral son muy tóxicos por lo que requieren un análisis previo completo del estado del paciente. El tratamiento se debe instaurar cuando existe con certeza un diagnóstico positivo de leishmaniasis y se debe llevar a cabo con el enfermo hospitalizado y se tiene que tener en cuenta la función cardíaca y renal mientras dure.

Sin embargo, la profilaxis más sencilla que se podría llevar a cabo es una adecuada sensibilización de la población más pobre para adoptar algunas medidas simples de prevención, como por ejemplo el uso de mosquiteros, de repelentes frente a todo tipo de insectos y tener cuidado a que no entren y no vivan animales en las viviendas.

3.6 Interacción hospedador-parásito

Leishmania spp. son parásitos digénicos y la proliferación en el hospedador vertebrado ocurre en el sistema fagocitico mononuclear que forma parte del sistema inmunitario. Aunque *Leishmania* spp. puede invadir muchos tipos de células, se dirigen selectivamente a macrófagos para replicarse y establecer la infección.

Cuando los macrófagos reconocen a *Leishmania* spp. se activan y toman el nombre de células efectoras “efecctor cells” [Van Assche et al., 2011]. Después de la activación de los macrófagos se observan muchos procesos celulares como la degradación fagolisosomal por parte de enzimas, la generación de radicales libres del oxígeno (ROS) y la producción de óxido nítrico (NO). Todos estos procesos provocan la fagocitosis y la destrucción del huésped indeseado [Van Assche et al., 2011].

Las formas promastigotas liberadas en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado, durante la picadura de un flebotomino infectado son fagocitadas por macrófagos. Así, las formas amastigotas liberadas después de la ruptura del macrófago hospedador son rápidamente fagocitadas por nuevos macrófagos [Van Assche et al., 2011].

El destino de la forma amastigota de *Leishmania* spp. en los macrófagos es determinada por el estado de activación de los mismos macrófagos [Alexander et al., 2005].

Aunque los linfocitos involucrados en la respuesta protectora producen predominantemente citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (INF- γ), los macrófagos pueden ser activados según dos vías, la clásica (M1) por parte de linfocitos Th1 y una alternativa (M2) por parte de linfocitos Th2 [Balaña-Fouce et al., 2012]. Los macrófagos activados por linfocitos Th1 inducen la producción de NO, llevando a la muerte parasitaria [Abrahamsohn et al., 1996; Muñoz-Fernández et al., 1992].

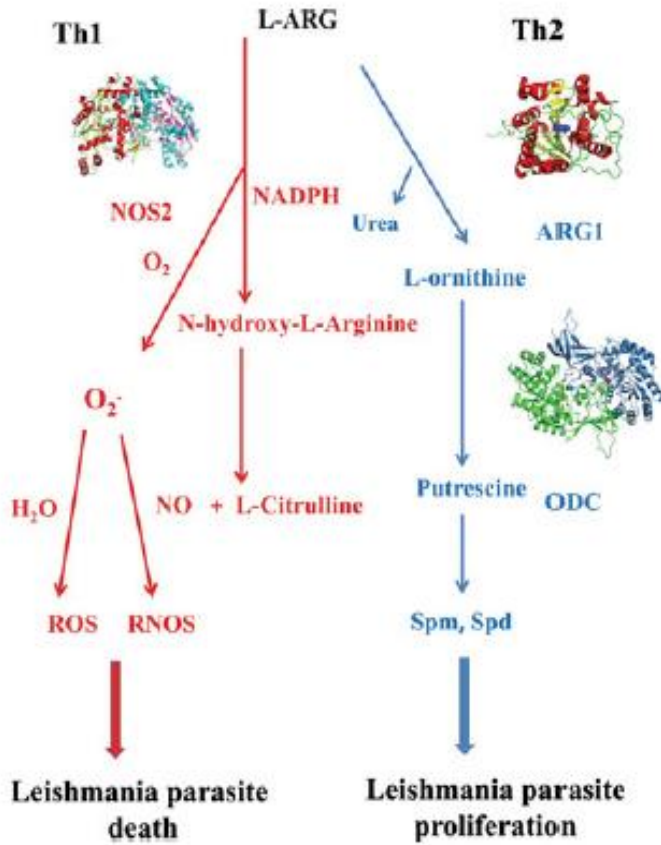


Fig. 1 L-Arg metabolism in the host macrophage. L-Arg can be catabolized in two different ways, since it is a common substrate for NOS2 (red, left) and ARG (blue, right), who are competitively controlled by Th1 and Th2 cytokines, thus determining the outcome of parasite infection: macrophages may either kill the parasites or promote their growth

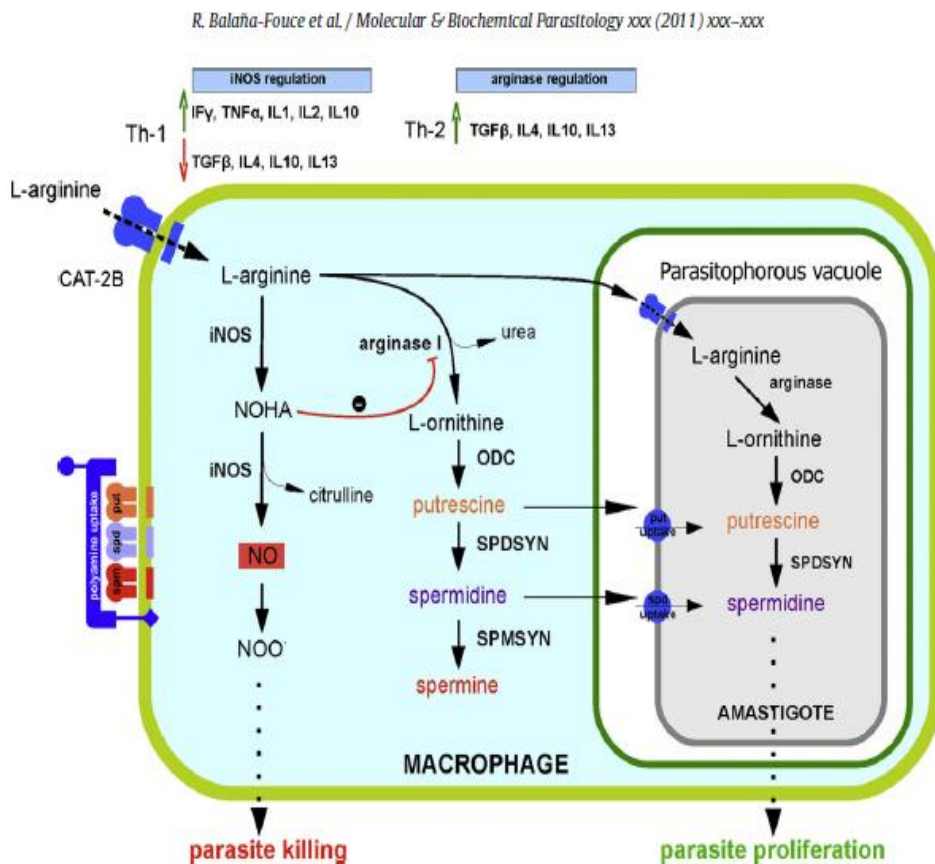
La mayoría de las actividades anti *Leishmania* spp. en los macrófagos humanos son mecanismos oxígeno-dependiente o sea mediados por intermediarios del oxígeno. INF- γ , un producto soluble de las células T, estimula directamente los mecanismos antimicrobianos tanto oxígeno-dependientes como oxígeno-independientes de macrófagos humanos (sanguíneos y tisulares), permitiendo por lo tanto a estas células

atacar los diferentes grupos patógenos (extra e intracelulares) [Murray et al., 1989]. La producción de Óxido Nítrico (NO) es inducida por el INF- γ a través de la ruta metabólica del aminoácido L-Arginina vía NOS (Oxidoreductasa) [Murray et al., 1989]. La respuesta Th2 también, parece estar estrechamente ligada a la ruta metabólica del aminoácido L-Arginina en la síntesis de poliaminas [Balaña-Fouce et al., 2012].

Leishmania spp. puede secuestrar la L-arginina presente en los macrófagos y emplearla para la síntesis de tripanotiona vía ornitina, putrescina y espermidina eludiendo de esta forma la actividad antimicrobiana de los macrófagos [Balaña-Fouce et al., 2012]. En los últimos años, distintos autores han estudiado esta vía metabólica para poder encontrar una diana eficaz para un nuevo tratamiento. Inhibiendo la síntesis de unos de los aminoácidos presentes en esta vía, en particular de la síntesis de putrescina, se ha encontrado una disminución considerable de la parasitemia en ratones infectados por *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) donovani* [Gyrlóy et al., 2011; Olenyik 2011; Mukhopadhyay et al., 1993; Gradoni et al., 1989; Keithly et al., 1987].

También se ha visto en un estudio con *Francisella tularensis* que las poliaminas limitaban la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de células del sistema inmunológico, promoviendo de esta forma la rápida propagación de la enfermedad [Russo et al., 2011].

Todavía no está muy claro si la disminución de la virulencia se debe a la sustracción de L-arginina a los macrófagos, con la consecuente disminución de NO y O_2^- o si es debido a un incremento de poliaminas en el interior del parásito, invertidas en la síntesis de trypanothiona con consecuente incremento de las defensas antioxidantes de *Leishmania* spp..



Se ha postulado que la interacción parásito/hospedador es mucho más compleja de lo que se piensa y que podría ocurrir una mutua influencia para dar lugar a la síntesis de determinados aminoácidos en

lugar de otros y también su cantidad, determinando por lo tanto la eliminación o no del parásito independientemente de la sollicitación de los macrófagos [Balaña-Fouce et al., 2012].

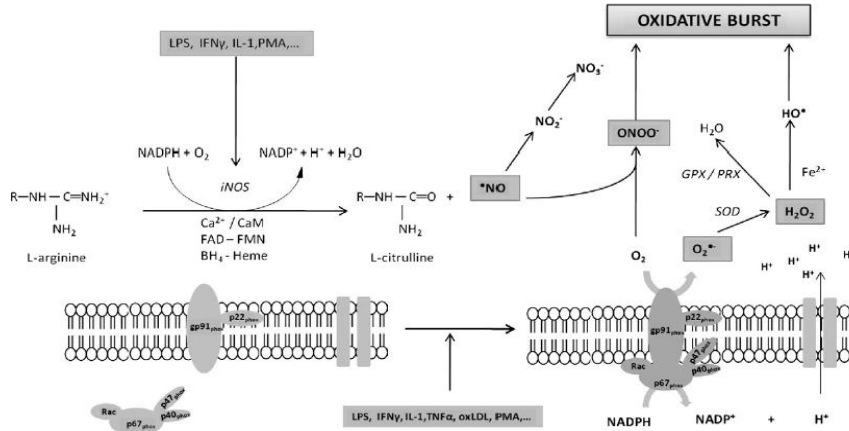


Fig. 2. ROS generation in a macrophage after exogenous triggering (e.g., *Leishmania* infection). The oxidative stress response starts with the activation of NADPH oxidase and iNOS. This leads to an increased production of nitric oxide and superoxide radicals, two key players in the subsequent cascade systems leading to a general oxidative burst.

3.6.1 Toxicidad de los Radicales Libres en *Leishmania* spp.

Se llama estrés oxidativo al daño celular asociado a la presencia de altas presiones (o tensiones) de oxígeno y otras moléculas derivadas (fundamentalmente los aniones superóxido e hidroxilo: O_2^- , OH^- y el peróxido de hidrógeno, H_2O_2) [Sies, 1985].

En las últimas décadas se ha visto que la causa de la evolución de muchas enfermedades de diferentes orígenes: como el Alzheimer [Praticó, 2008], enfermedades cardiovasculares [Kohlhaas et al., 2010] y otras relacionadas con la vejez [Wang et al., 2012; Balaban et al., 2005; Wang et al., 1998] son los radicales libres.

Durante la respiración mitocondrial, se forman muchas especies reactivas del oxígeno (ROS), incluyendo el radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\bullet OH$), así como especies reactivas del nitrógeno (RNS), incluyendo el óxido nítrico ($NO\bullet$) [Serarslan et al., 2005; Bogdan et a., 2000]. $O_2^{\bullet-}$ es producido por los macrófagos NADPHox durante la fase fagocitaria de la infección y por la forma promastigota de *Leishmania* spp..

La L-arginina, precursor de las poliaminas, y aminoácido esencial de *Leishmania* spp. es empleada vía NOS por parte del macrófago para la producción de NO y del ion Superóxido (O_2^-) con la consecuente formación de peróxido nítrico ($ONOO^-$) que lleva a la muerte del parásito [Balaña-Fouce et al., 2012; Abrahamsohn et al., 1996; Muñoz-Fernández et al.,1992].

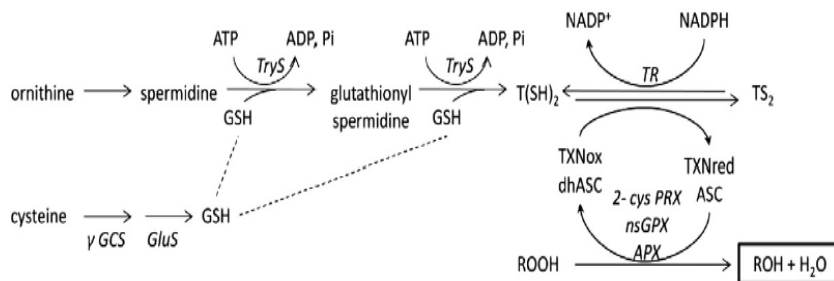
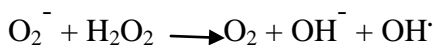
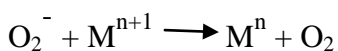


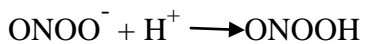
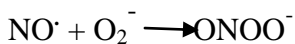
Fig. 3. *Leishmania* peroxidase cascade system for detoxification of hydroperoxides. NADPH is the primary electron donor for reduction of TS_2 to $T(SH)_2$. The reducing enzyme and proteins trypanothione reductase and trypanredoxin or ascorbate provide the necessary reducing equivalents to two-cysteine peroxidoredoxin (2-cys PRX), non-selenium glutathione peroxidase (nsGPX) or ascorbate peroxidase (APX) for final reduction of hydroperoxides (ROOH). dhASC, dehydroascorbate; GluS, glutathione synthetase; TryS, trypanothione synthetase.

ROS y RNO en presencia excesiva pueden degradar numerosas biomoléculas, incluyendo DNA, carbohidratos y proteínas [Seraslan et al., 2005].

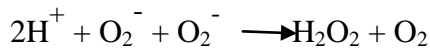
La gran toxicidad del O_2^- y del H_2O_2 no es debida directamente a estos dos radicales libres sino más bien al radical hidroxilo (OH^\cdot) que se forma según las reacciones de Fenton:



Además se ha descrito otro mecanismo que lleva a la producción del radical hidroxilo:



La combinación del NO· con el ion superóxido compite con la dismutación del ion superóxido, según la siguiente reacción:

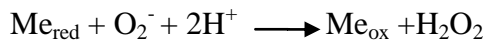
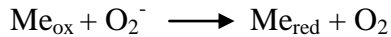


[Docampo, 1995]

3.6.2 Superóxido Dismutasa y la defensa contra los Radicales Libres de *Leishmania* spp.

Contra el radical O_2^- , consecuencia de la síntesis de la L-arginina por parte del macrófago, interviene la Superoxido Dismutasa (SOD), ya que *Leishmania* spp. no posee catalasa, que dismuta el radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 tanto durante la fagocitosis como en la fase intracelular, en ambas formas: promastigote y amastigote. El H_2O_2 es convertido en H_2O por las defensas antioxidantes de *Leishmania* spp.: T(SH)₂ (trypanothiona reductasa), TXN (trypanoredoxina), PRX (peroxiredoxina) and APX (ascorbate Peroxidasa) [Piacenza et al., 2007; Van Assche et al., 2011] enzimas involucrados en las llamadas Thiol Redox Balance de las que depende la supervivencia de los parásitos y la propagación de la infección.

Las SOD son metaloenzimas que catalizan las siguientes reacciones:



[Sienkiewicz et al., 2004]

En la naturaleza están presentes tres clases de SOD, que dependen del cofactor metálico que presentan, la Cu/Zn-SOD, la Mn-SOD y la Fe-SOD.

En los mamíferos están presentes la Cu/Zn-SOD a nivel citosólico y la Mn-SOD a nivel mitocondrial [Fridovich 1995]. La Cu/Zn-SOD está presente también en bacterias mientras que la Mn-SOD además de las matrices mitocondriales se localiza también en procariotas.

La Fe-SOD se encuentra en procariotas, cloroplastos y protozoos.

La Fe-SOD y la Mn-SOD poseen secuencias y estructuras muy parecidas por lo que se cree que puedan haber tenido un común ancestro [Wintjens et al., 2004]

Actualmente, también, se acepta la inclusión de una nueva isoforma de SOD unida a un átomo de Níquel (Ni-SOD) descrita en algunas especies de *Streptomyces* [Youn et al., 1996].

Además de ser una clave fundamental en la proliferación de *Leishmania* spp. y de la lucha contra las ROS la Superóxido Dismutasa ha demostrado ser un buen marcador molecular en diferentes trypanosomatidos: *Phytomonas* spp. [Marín et al., 2006; 2004], *Trypanosoma cruzi* [Mateo et al., 2010; 2008] y *Leishmania (L.) infantum* [Marín et al., 2007].

3.7 Aislamiento y Purificación de la Fe-SOD

La Fe-SOD se ha identificado en varios protozoos como: *Plasmodium* spp. [Dive et al., 2003], *Acanthamoeba castellani* [Kim et al., 2012], *Entamoeba histolytica* [Tannich et al., 1991], *Toxoplasma gondii* [Brydges et al., 2003], *Perkinsus marinus* [Schott et al., 2003] y *Trichomonas vaginalis* [Viscogliosi et al., 1998].

También en la familia de los trypanosomatidos la Fe-SOD ha sido identificada y estudiada, demostrándose la presencia de más de una isoforma, en muchos miembros de esta: *Crithidia fasciculata* [Le Trant et al., 1983], *Phytomonas* aisladas en *Euphorbia characias* [Marin et al., 2004], *Trypanosoma cruzi* (cepa Maracay) [Mateo et al., 2008] y *Trypanosoma brucei* [Dufernez et al., 2006].

La isoforma extracelular de la SOD es la más importante y desempeña un papel muy relevante en la patogénesis de muchas

enfermedades pulmonares, neuronales y cardiovasculares [Suliman et al., 2001; Fukai et al., 2002].

Aunque se haya visto su gran importancia hay muy pocos trabajos en la literatura en el que los autores hayan purificado esta proteína.

En 2006 Marín y colaboradores purificaron la Fe-SOD excretada por *Phytomonas* demostrando que tenía un pI de alrededor 3.6 y un peso molecular de alrededor 22kDa [Marín et al., 2006].

Posteriormente, Mateo y colaboradores purificaron y caracterizaron la Fe-SOD excretada por *T. cruzi*, demostrando que presentaba unas características similares a la encontradas por Marín y colaboradores en 2006, punto isoeléctrico alrededor de 3.8 y peso molecular alrededor de 25kDa [Mateo et al., 2008].

Ambos autores, tras haber aislado y purificado la Fe-SOD excretada, respectivamente por *Phytomonas* y *T. cruzi*, demostraron su característica inmunogenica proponiéndola como marcador molecular [Mateo et al., 2006; Marín et al., 2006].

Materiales y Métodos

4. Materiales y Métodos

4.1 Cultivo celular

Como material biológico para el estudio y caracterización de la Fe-SODe, se han utilizado formas promastigotas de 4 especies de *Leishmania*:

L. (L.) infantum (MCAN/ES/2001/UCM-10)

L. (L.) amazonensis (MHOM/BR/73/M1845)

L. (V.) peruviana (MHOM/PE/84/LC26)

L. (V.) braziliensis (MHOM/BR/75/M2904)

Los parásitos se cultivaron de forma axénica a 27°C en frascos para cultivo celular Cellstar® - 250 ml (Greiner Bio-One®), empleando medio MTL (Medium Trypanosomes Liquid) (Gibco®) suplementado con un 10 % (V/V) de suero bovino fetal (SBF, PAA®), previamente inactivado por calentamiento (56 °C, 30 min). Los parásitos se cultivaron hasta una densidad de crecimiento de aproximadamente 1×10^7 células/ ml. (estimada mediante recuento en cámara de contaje hemocitométrica de Neubauer®)

Así, las células fueron recolectadas en la fase logarítmica (exponencial) del crecimiento por centrifugación (1500 x g / 10 minutos a temperatura ambiente). El pellet celular obtenido fue resuspendido en 25 ml de medio MTL sin enriquecer con suero bovino fetal e incubado durante 24h a 27°C.

4.2 Preparación de la fracción H

Las formas promastigotas (pellet) obtenidas en su fase exponencial de crecimiento como se describe anteriormente, fueron sometidas a un proceso de lisis o rotura celular.

El pellet, así obtenido, fue sometido a un proceso de lisis o rotura celular. Para ello, una vez eliminados los restos del medio de cultivo mediante dos lavados con PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7), se resuspendió dicho sedimento en 3 ml de tampón de lisis STE –**Tampón 1**– (250 mM sacarosa, 25 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 7.8) y se sonicó en frío en tres ciclos de 60 V durante 30 s (con intervalos de 1 min entre ciclos). El lisado celular se centrifugó (2500 g/10 min/ 4 °C), para descartar los restos de membranas, el pellet resultante se lavo 3 veces con el **Tampón 1** hasta llegar a tener una fracción de 9 ml de volumen total. Esta fracción fue centrifugada una última vez a las mismas condiciones de las anteriormente descritas, obteniendo un nuevo sobrenadante al que

llamamos Homogenado (Fracción H).

4.3 Obtención y Purificación de la Hierro Superoxido Dismutasa excretada (Fe-SODe)

El precipitado celular obtenido según la manera descrita en el primer apartado fue resuspendido en 25 ml de medio MTL sin enriquecer con SBF e incubado durante 24h a 27°C. Tras dejar el cultivo 24 horas en medio sin suero bovino fetal se centrifuga (1500 x g durante 10 minutos), descartándose el precipitado celular y se continúa con el sobrenadante que fue filtrado a través de membrana de nitrocelulosa (Minisart®, Φ 20 μ m).

El sobrenadante así obtenido se somete a precipitación proteica con sulfato amónico entre el 35 y el 85%. Según el protocolo, primero se realizó a una concentración salina del 35%, seguido por centrifugación de 9000 x g /20 minutos a 4°C. Tras centrifugar el sobrenadante se somete a una segunda precipitación con sulfato amónico hasta una concentración total del 85%. Una vez disuelta la sal se deja reposar en hielo durante 20 minutos y se vuelve a centrifugar a 9000 x g /20 minutos a 4°C.

1. **Precipitación al 35%:**

Volumen fracción (ml) x 0.35 x 70.5 /100 = x gr de sulfato amónico.

2. **Precipitación al 85%:**

Volumen de S35 (ml) x 0.85 x 70.5/100 – x = y gr de sulfato amónico

El precipitado obtenido en esta segunda centrifugación fue resuspendido en 2.5 ml de agua destilada y desalinizando, hasta un volumen de 3.5 ml, a través de una columna cromatografica de Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences®, PD 10 column), previamente equilibrada con 25 ml de agua destilada (Fraccion P85 o Fe-SODe-np). Por último, fueron añadidos 25 µl de anti-proteasa (Protease Inhibitor Complete Mini, Roche®) para minimizar la acción de las proteasas presentes en el medio.

Las fracciones P85 de cada especie de *Leishmania* fueron purificadas independientemente a través de dos procesos continuos de cromatografía en columna: primero intercambio iónico y posteriormente filtración por peso molecular.

Tras haber concentrado la fracción P85 hasta un volumen de 2 ml liofilizando (LyoQuest, Telstar®) esta fue aplicada a una columna de intercambio iónico, QAE-Sephadex A-50 (Sigma-Aldrich®, 30×2Φ cm),

previamente equilibrada con el **Tampón 2** (tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7.4, 1 mM EDTA). La elución de las proteínas absorbidas en la matriz se realizó mediante la aplicación de un gradiente lineal de KCl (0-0'6M) recolectando fracciones de 2.5 ml.

Las fracciones que mostraron la actividad de la SOD fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración en tubos Amicon® Ultra-0.5, 10K (Millipore®) a 11200 g durante 30 min hasta un volumen de 2 ml (pico Q1e).

El pico Q1e, así obtenido se aplicó a una columna de filtración por peso molecular, Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich®, 75×1.6Φ cm) previamente equilibrada con el Tampón 2 y la muestra fue eludida con 200 ml del mismo tampón.

Las fracciones eluidas (4.5ml cada una) que mostraron actividad de la SOD fueron reunidas (Pico Fe-SODe), concentradas (hasta una concentración de aproximadamente 2 mg/ml) y empleadas para los experimentos descritos a continuación.

4.4 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las fracciones H, P85e y de los picos Q1e y Fe-SODe, y de todas las fracciones obtenidas por la elución de

las dos columnas fueron cuantificadas usando el método de Bradford (Sigma Bradford test), el que se emplea albúmina de suero bovino (BSA) como curva patrón [Bradford, 1976].

4.5 Cuantificación de la Actividad Enzimática

La actividad de la SOD fue determinada en la fracción P85e, en los picos Q1e y Fe-SODe y de todas las fracciones obtenidas por la elución de las dos columnas fue cuantificada usando el método espectrofotométrico de la oxidación por luz ultravioleta del NBT previamente descrita por Beyer y Fridovich [Beyer and Fridovich, 1987]

4.5.1 Cuantificación de la Actividad Enzimática Específica

En cada fracción testada, la obtención de los valores de absorbancia inicial y final fue aplicada a las siguientes ecuaciones a fin de calcular la actividad específica final:

Diferencia entre absorbancia inicial y medida tras 10 minutos:

$$A_0 - A_{10} = A_f$$

Cálculo absorbancia relativa:

$$A_f / A_c = A_r \quad \text{siendo } A_c \text{ la media de los controles}$$

Cálculo porcentaje de absorbancia relativa:

$$(1 - Ar) \cdot 100 = Ar \%$$

Actividad:

$$\frac{Ar \% \cdot 10^3}{36,4 \cdot Vf} = A \text{ (U/ ml)}$$

donde Vf es el volumen de muestra

Actividad total:

$$A \text{ (U/ ml)} \cdot Vt = At \text{ (Ut)}$$

Actividad específica:

$$Ae \text{ (U/ mg)} = At / P$$

(A₀= Absorbancia inicial; A₁₀= Absorbancia a los 10 minutos; Af= Absorbancia final; Ac= Absorbancia controles; Ar= Absorbancia relativa; Vf= Volumen final; Ae= Actividad específica; P= concentración total de proteínas)

4.6 Determinación del Peso Molecular (PM)

El peso molecular aparente fue determinado usando la ecuación

(y = -0.952x+118.51) obtenida según la línea de tendencia lineal generada por el programa Microsoft Excel® (2007) de la Cromatografía de filtrado en Sephadex G-100 de proteínas de peso molecular conocido, usadas como estándar: Albúmina de suero bovino, 67kDa; Ovoalbumina,

43kDa; Anhidrasa Carbonica, 30kDa y Citocromo C, 12.4kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis

Posteriormente el peso molecular de las proteínas purificadas fue confirmado con la aplicación de la fracción Fe-SODe a electroforesis en gel de Nativa (PhastGel Homogeneous 12.5%) como descrito en el manual del Phast System (GE Healthcare Life Sciences ®). Como referencia se ha empleado como marcador el LMW (Low Molecular Weight, Ge Healthcare Life Science®) que contenía: Albúmina de suero bovino, 67kDa; Ovoalbumina 43kDa, Anhidrasa Carbónica, 30kDa; Inibidor de la tripsina de las alubias de soja, 20.1kDa y la α -lactoalbumina 14.4kDa.

Los geles fueron teñido según la tinción del nitrato de Plata de acuerdo con el manual del Phast System (GE Healthcare Life Sciences®).

4.7 Determinación del Punto Isoeléctrico (pI)

La electroforesis en Phast Gel en gel de isoelectrofoque (IEF) 3-9 de poliacrilamida nos permite determinar el punto isoelectrico del enzima purificado [Bécuwe et al., 1996] usando como marcadores: Tripsinógeno (9.3), Acido lentil-lectina (8.8), Mioglobina de corazón de caballo (6.8), Inibidor de la tripsina de soja (4.6) y Anyloglucosidase de *Aspergillus niger* (3.6).

Los geles posteriormente fueron teñidos con la tinción de Nitrato de Plata, según lo descrito anteriormente. Y con el método de Beyer y

Fridovich [Beyer and Fridovich, 1987], se reveló la actividad de la SOD que aparece como una única banda acromática en un fondo azul.

Para ello, los geles fueron sumergidos en la solución de revelado fresca [27 ml Tampón Fosfato Potásico 50 mM pH 7.8, 1 ml NBT 1.41 mg/ml, 1.5 ml L-Metionina 30 mg/ml y 0.75 ml Tritón X-100 1 % (V/V), a la cual se le añaden in situ 0.4 ml de una solución de Riboflavina (0.044 mg/ml)]. Posteriormente, la mezcla es incubada en presencia de luz UV a temperatura ambiente bajo agitación suave hasta que el gel adquiriera la tonalidad deseada y el contraste entre las bandas y el resto del gel se haga patente.

4.8 Anticuerpos policlonales de ratones

La obtención anticuerpo específico frente a la Hierro SODe de *L. (V.) peruviana* (Fe-SODe-np-Lp) se inmunizaron dos ratones hembras Balb-C de 4 semanas de vida, se llevó a cabo siguiendo el protocolo de inmunización que a continuación se describe [Current Protocols, 1995].

La separación del antígeno (concentración de proteína de 2mg/ml) es llevó a cabo a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida IEF 3-9, como descrito anteriormente. Una vez corrido el gel se cortó la primera línea correspondiente al primer pocillo del peine usado y se reveló la actividad de la SOD con el método de Fridovich [Beyer y Fridovich, 1987]. Una vez que se reveló la posición de nuestra enzima se

cortó la respectiva zona en la porción de gel restante y se homogeneizó con con adyuvante de Freund.

A los ratones se le suministraron 4 inyecciones inmunizantes intraperitonealmente, la primera fue con el adyuvante completo de Freund's (CFA) y las siguientes 3 con el adyuvante incompleto de Freund's (IFA) cada 10 días.

A los 15 días de la última inmunización se recolectaron los sueros a través de una punción cardiaca. De la misma forma se recolectó suero de ratones que se inmunizaron con homogeneizado de poliacrilamida sin proteínas tratado con CFA en un primer momento e IFA posteriormente, como descrito previamente.

La sangre así obtenida fue centrifugada (4000 x g durante 10 min), desechando el coágulo, guardando los sobrenadantes (sueros) del grupo de ratones inmunizados frente al antígeno Fe-SODe no purificado. Los sueros así obtenidos se ensayaron a una dilución 1/100 y 1/500 frente a la Fe-SODe-np de *L. (L.) peruviana* por la técnica de Western blot, descrita a continuación.

4.9 Titulación de la Fe-SODe purificada de *L. (L.) infantum* y *L. (V.) peruviana*

Para la titulación de la fracción antigénica Fe-SODe purificada de *L. (L.) infantum* y *L. (V.) peruviana* hemos ensayado 6 diferentes concentraciones (0.05µg, 0.1 µg, 0.25 µg, 0.5 µg, 0.75 µg y 1 µg) con 3 diferentes diluciones del suero positivo de referencia (1/100, 1/200 y 1/500) por la técnica de ELISA descrita a continuación.

4.10 ELISA

La ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [Voller et al., 1976] es un método de diagnóstico que permite poner de manifiesto la presencia de anticuerpos o antígenos en muestras biológicas. Es una técnica muy sensible y de uso muy extendido, que permite analizar en un solo ensayo multitud de antígenos y/o anticuerpos a concentraciones diferentes.

En nuestro estudio utilizamos el ELISA indirecto, para el cual nos servimos de placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano (Nunc®). Las placas fueron sensibilizadas con 100 µl de las fracciones antigénicas diluidas en tampón carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 8.2 -**Tampón 3**- durante 2 horas a 37°C. Las fracciones antigénicas ensayadas en esta técnica han sido: la fracción H, la Fe-SODe-np a una concentración final

por pocillo de 5 µg, y 1.5 µg respectivamente y la SODe purificada a una concentración total de 0.5 µg y 0.05 µg.

Los antígenos no fijado se eliminaron lavando la placa 3 veces con 250 µl de tampón de lavado (**Tampón 4**: Tween 20® 0.05 % en PBS). Los sitios de adsorción libres (en los que no se ha unido el antígeno) se bloquearon con el **Tampón 5** (Tween 20®, 0.2 % BSA en PBS) mediante incubación durante 2 h a temperatura ambiente y agitación para impedir que se produzcan uniones no específicas entre la placa y el suero. Tras lavar como anteriormente, la placa se incubó durante 45 min en presencia de 100 µl de suero (Suero canino a una dilución 1/80 y suero humano a una dilución 1/200). A continuación, se lavó la placa como se ha descrito anteriormente con el **Tampón 4** y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C con 100 µl el inmunoconjugado correspondiente (Anti IgG/anti-dog peroxidase or Anti IgG/anti-human peroxidase, Sigma-Aldrich®) a una dilución 1/1000.

Tras lavar como descrito anteriormente con el **Tampón 4**, se añadió 100 µl a cada pocillo de sustrato del inmunoconjugado, orto-fenilendiamina dihidroclorhidrica (OPD, Sigma-Aldrich®) en **Tampón 7**: 12.5ml H₂O₂ destilada, 12.5 ml Tampón citrato-fosfato, 0.1M, pH 5 - **Tampón 6**- y 10µl de H₂O₂ 30%. Incubamos la placa 20 minutos en oscuridad, tras lo cual bloqueamos la reacción con 50µl de una solución

CIH 3N y la absorbancia se midió a 492nm en el lector de ELISA (Sunrise TM, TECAN).

La media y la desviación standard (SD) de la densidad óptica de los controles negativos han sido utilizado para calcular el valor de corte (media + 3xSD).

4.11 Western blot

También llamado Inmunoblot [Burnette, 1981; McLellan, 2004], es una potente herramienta molecular utilizada en inmunodiagnóstico, dada su versatilidad a la hora de detectar de manera específica una respuesta inmunitaria frente a una proteína en concreto.

Para la titulación de sueros por Western-Blot, la fracción fue concentrada (hasta una concentración de 2 mg/ ml) y aplicada a un IEF 3-9. A continuación, las diferentes proteínas contenidas en el gel fueron sometidas a un proceso de transferencia a una membrana de nitrocelulosa, para lo cual fue sumergido en tampón de transferencia (**Tampón 8**: Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %, pH 8.3) durante 20 min. Lo mismo se hizo con la membrana de nitrocelulosa a la que se transferirán las muestras (Hybond-C Extra, Pharmacia®) y con cuatro papeles de filtro, que aseguran un exceso de medio acuoso durante el proceso. Antes de realizar la transferencia, se separó el gel del soporte de plástico, para lo cual fue empleado el accesorio de cortado con hilo de diamante que se

suministra con el Phast System®. A continuación se procedió a la transferencia, disponiendo el gel, las membranas y los papeles en “sándwich”, asegurando un contacto íntimo entre el gel y la membrana, en el dispositivo de transferencia PhastTransfer®, según las indicaciones que aparecen en el manual de instrucciones. Terminado el proceso de electro transferencia (30 min), se pudo comprobar el éxito del mismo mediante tinción con rojo Ponceau, visualizando las proteínas en la superficie de la membrana. Los restos de colorante fueron eliminados mediante lavados repetidos con agua. Posteriormente la membrana se bloqueó mediante incubación en tampón Tween 20® 0.2 % y gelatina 0.4 % en PBS (**Tampón 9**). La membrana se dejó bloqueando durante 2 h a temperatura ambiente. Lavamos tres veces (**Tampón 10**: Tween 20® 0.1 % en PBS) para eliminar los restos de tampón de bloqueo y se incubó la membrana con los sueros diluidos en Tampón 10 a las diluciones deseadas (1:80, 1:100, 1:200 y 1:500) durante otras 2 h. Transcurrido este tiempo y después de lavar como se describió anteriormente, las membranas fueron nuevamente incubadas durante 2 h, con el inmunoconjugado (Anti IgG / anti-dog peroxidase or Anti IgG/anti-human peroxidase, Sigma-Aldrich®) a una dilución 1/1000. Lavamos e incubamos con el sustrato de la peroxidasa 0.5 mg/ ml de DAB (3,3 diaminobenzidina) en tampón Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 (**Tampón 11**) y 1:5000 H₂O₂ durante 15 min, tras lo cual se detuvo la reacción por adición de agua destilada en exceso.

4.12 IFI

Los 113 sueros procedente de Perú han sido ensayado por la técnica del IFI (Inmuno fluorescence indirect) a una dilución final de 1/40 de acuerdo con el método de Camargo [Camargo et al., 1966] empleando un microscopio de fluorecencia Olympus BH-2.

La fracción antigénica empleada en este ensayo consistía en promastigotas de *L. (V.) peruviana*.

Todas las muestras fueron ensayadas en tres replicas en portaobjeto para inmunofluorecencia y cada título mayor que 1/40 se consideró positivo.

La técnica aquí descrita ha sido desarrollada por la Doctora Gloria Minaya en el Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú.

4.13 Sueros

4.13.1 Sueros humanos

4.13.1.a Sueros procedentes de Perú

Las muestras de sangre ensayadas en este estudio fueron recogidas en el Instituto Nacional de Salud de Lima (Perù). Dividimos las muestras en dos grupos de sueros según la manifestación clínica de los pacientes: 45

sueros recolectado de paciente con Leishmaniasis Selvática (SL), y 68 sueros de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Andina (ACL). Todos los pacientes presentaban sintomatología de leishmaniasis y presencia demostrada del parásito en biopsias de las lesiones cutáneas mediante diagnóstico directo.

4.13.1.b Sueros procedentes de Colombia

51 sueros de pacientes con lesiones dérmica causadas por *Leishmania* spp. han sido recolectado entre el 2008 y el 2009 en el Centro Dermatológico Federico Lleras, Bogotá, Colombia.

El historial completo no está disponible para estos sueros.

4.13.1.c Sueros procedentes de México

Un total de 213 sueros de humanos aparentemente sano, no presentaban ninguna lesión causada por *Leishmania* spp. fueron recolectados entre el 2011 y el 2012 en los Estados de Hidalgo, México y de Nuevo León, México por la Doctora María Helena Villagrán (Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Medicina, México). El historial completo para estos sueros no está disponible.

4.13.1.d Sueros procedentes de Chile

10 sueros de pacientes diagnosticados enfermos de Chagas, se utilizaron como controles para ensayar la posible reacción cruzada con el antígeno obtenido. Los 10 sueros fueron proporcionado por el Dr. Werner Apt (Universidad Católica de Chile, Facultad de Medicina, Santiago de Chile) de enfermos chagásicos en tratamiento desde hace 10 años que viven en regiones donde la leishmaniasis no es endémica.

4.13.1.e Sueros controles negativos

10 sueros de ciudadanos españoles sanos que no eran reactivo a las pruebas serológicas, fueron donados por el Banco de Sangre de Granada (España). El informe de consentimiento fue obtenido individualmente por parte de cada paciente antes de la recolección de la muestra de sangre.

4.13.2 Sueros Caninos

4.13.2.a Sueros procedentes de España

Un total de 145 sueros fueron recolectados en Clínicas Veterinarias entre el 2010 y el 2011 en diferentes ciudades de la Comunidad Autónoma Andalucía (76 procedentes de Granada, 17 de Cádiz, 9 de Jaén, 5 de Málaga, 15 de Sevilla, 7 de Córdoba y 15 de Huelva). El completo historial no es disponible.

4.13.2.b Sueros procedentes de Italia

Un total de 10 sueros de perros que dieron histológicamente y serológicamente positivo a *L. (L.) infantum* han sido donado por la MVD Claudia Paltanin de la Università di Milano. Los sueros han sido recolectados en 2010 en la región Lombardía, entre las ciudades de Milán y Pavía.

4.13.2.c Sueros controles negativos

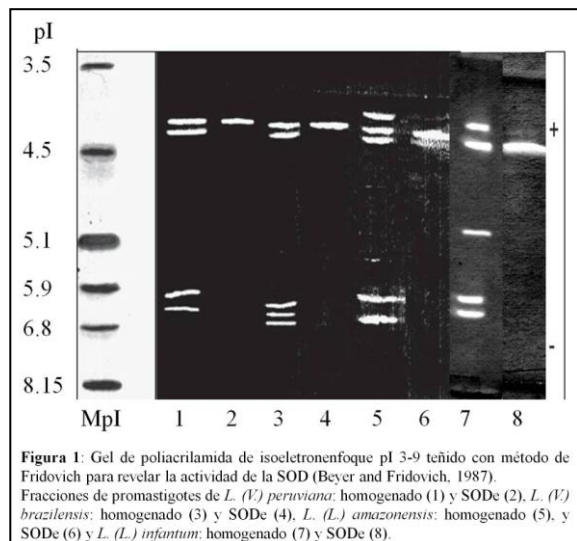
10 sueros de perros sanos y que presentaban reacción negativa a las técnica serológicas para *Leishmania* spp., donados por las Clínicas Veterinarias de Granada fueron usado como controles negativos para determinar el valor de corte en la técnica de ELISA.

Resultados

5. Resultados

En este trabajo hemos detectado por primera vez la actividad de la Fe-SOD en lisado de promastigotas (homogenado o fracción H) de *L. (L.) infantum*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, y *L. (L.) amazonensis*, a través de electroforesis en gel de isoelectroenfoque 3-9 y la posterior tinción para revelar la actividad de la Fe-SOD según el método descrito por Beyer and Fridovich. En homogenado de *L. (V.) peruviana* aparecen 4 isoformas diferentes con distinto punto isoeléctrico: 3.7, 4.0, 6.9 y 6.4, respectivamente (Fig. 1, línea 1); en *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) amazonensis* se detectaron 5 isoformas con respectivamente diferente punto isoeléctrico (**Fig. 1**, líneas 3,6 y 7).

Solo una banda de actividad Fe-SOD fue detectada en las cuatro especies objeto de nuestro estudio (**Fig. 1**, línea 2, 4, 6 y 8 respectivamente), cuando el parásito fue incubado durante 24 h en un medio sin suero y



posteriormente procesado como se ha descrito en Material y Métodos. El punto isoeléctrico de esta Fe-SODe resultó ser de alrededor de 4.0 para las cuatro especies de *Leishmania*.

El sobrenadante recolectado después de haber centrifugado 1×10^7 /ml células cultivadas durante 24h en medio MTL sin suero, filtrado y sometido a precipitación con sulfato amónico, con el objetivo de obtener el precipitado (P85e), fue finalmente desalinizado y concentrado como se ha descrito en Materiales y Métodos.

La fracción P85e (o Fe-SODE-np) de las 4 especies de *Leishmania* estudiadas en este trabajo se pasaron primero por una columna cromatografía de intercambio iónico Sephadex QAE A-50.

Por una totalidad de 4 réplicas hemos pasado: 57.21 mg de Fe-SODE-np de *L. (L.) infantum* (**Tabla 2**), 34.71 mg de Fe-SODE-np de *L. (V.) braziliensis* (**Tabla 3**), 24.15 mg de Fe-SODE-np de *L. (V.) peruviana* (**Tabla 4**) y 33.78 mg de Fe-SODE-np de *L. (L.) amazonensis* (**Tabla 5**).

Fraction	Total protein (mg)	Total activity* (Units) ± SD	Specific activity* (U/mg ± SD)	Purification	Yield (%)
P85**	57.21	443.88±21.98	7.76±0.72	1	100
Peak Q1**	1.986	436±1.75	219.54±0.389	28.29	98
SODE-Li	0.387	339±0.00	875.97±0.00	112.88	76

Tabla 2: Resumen purificación de la Fe-SODE de *L. (L.) infantum*
 *Actividad de la SOD determinada por el metodo Beyer and Fridovich.
 ** 4 replicas en total
 SD = Desviación estandard generada por los valores de las 4 replicas.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity* (Units) ± SD	Specific activity* (U/mg ± SD)	Purification	Yield (%)
P85**	34.71	663.31±9.98	7.25±4.41	1	100
Peak Q1**	1.106	631.59±5.05	322.49±7.89	44.48	95
SODe-Lb	0.442	395±0.00	893.66±0.00	123.26	60

Tabla 3: Resumen purificación de la Fe-SODe de *L. (V.) braziliensis*
*Actividad de la SOD determinada por el método Beyer and Fridovich.
** 4 replicas en total
SD = Desviación estandar generada por los valores de las 4 replicas.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity* (Units) ± SD	Specific activity* (U/mg ± SD)	Purification	Yield (%)
P85	24.15	146.84±14.40	6.08±0.51	1	100
Peak Q1	0.838	139.54±3.71	166.51±1.87	27.38	95
SODe-Lp	0.163	102.79±0.00	630.61±0.00	103.71	70

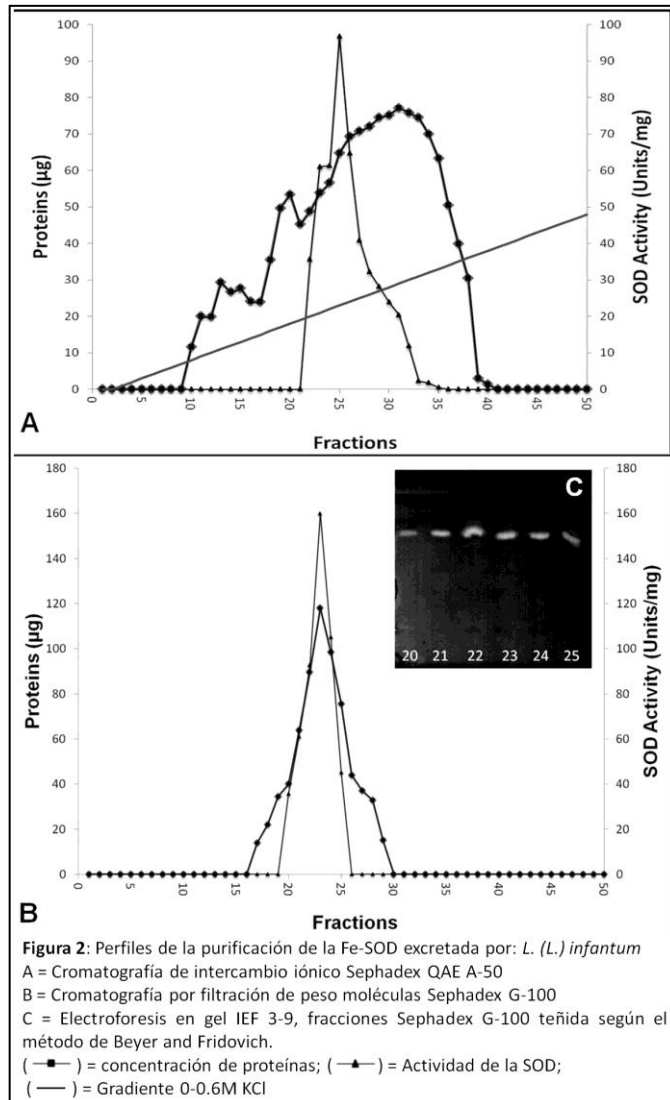
Tabla 4: Resumen purificación de la Fe-SODe de *L. (V.) peruviana*
*Actividad de la SOD determinada por el método de Beyer and Fridovich.
** 4 replicas en total
SD = Desviación estandar generada por los valores de las 4 replicas.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity* (Units) ± SD	Specific activity* (U/mg ± SD)	Purification	Yield (%)
P85	33,78	204,67±2,26*	6,058±4,78*	1	100
Peak Q1	1,299	200,17±1.43*	154,09±1,58*	25,43	98
SODe-La	0,288	177,31±0.00	615,65±0,00	101,62	86

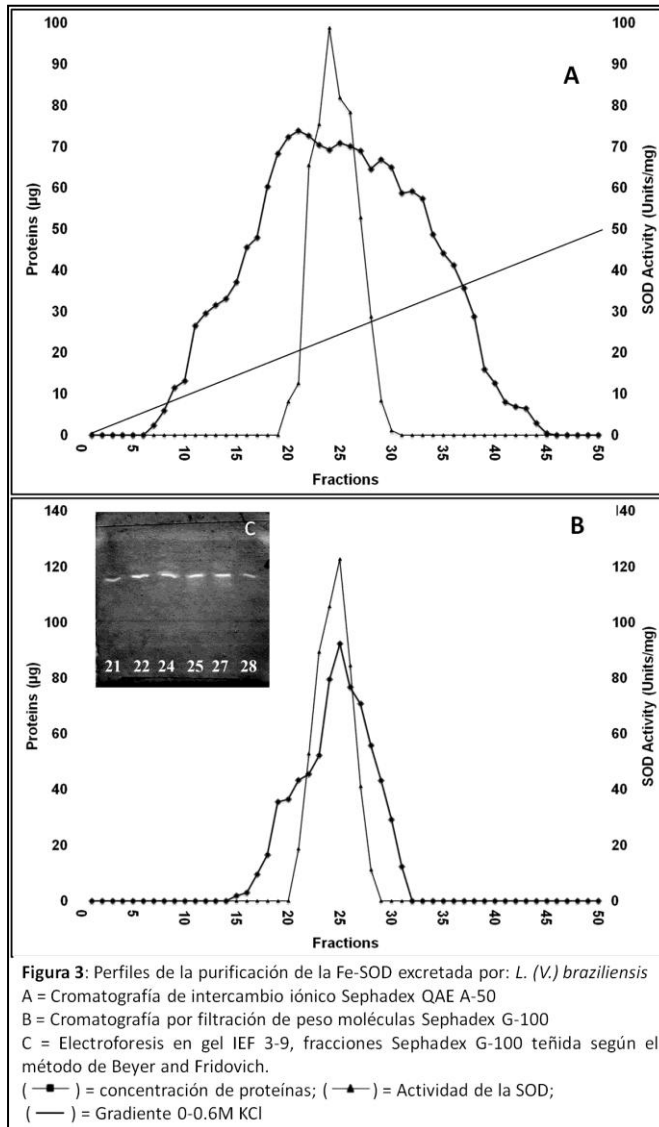
Tabla 5: Resumen purificación de la Fe-SODe de *L. (L.) amazonensis*
*Actividad de la SOD determinada por el método Beyer and Fridovich.
** 4 replicas en total
SD = Desviación estandar generada por los valores de las 4 replicas.

La concentración de proteínas y la actividad de la SOD han sido cuantificadas en todas las fracciones recogidas mediante las técnicas de Bradford y de Bayer and Fridovich, observando sólo un pico de actividad, que llamamos Q1, en las cuatro especies de *Leishmania* prácticamente en las mismas fracciones.

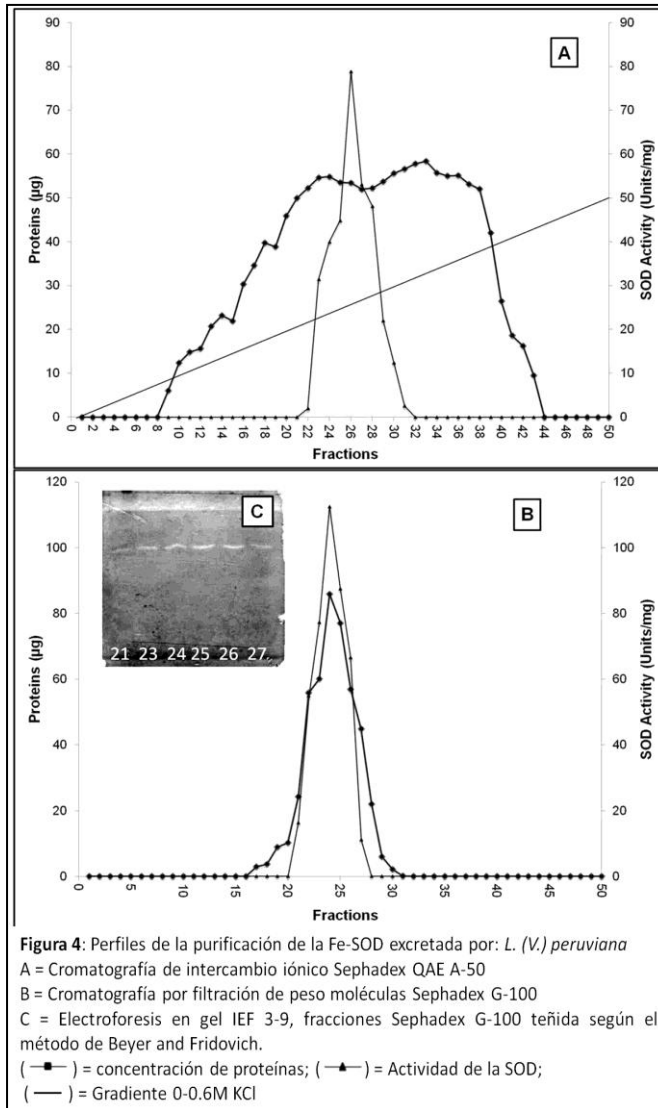
Pico Q1 de: *L. (L.) infantum* entre las fracciones 20 y 34 (**Fig. 2-A**).



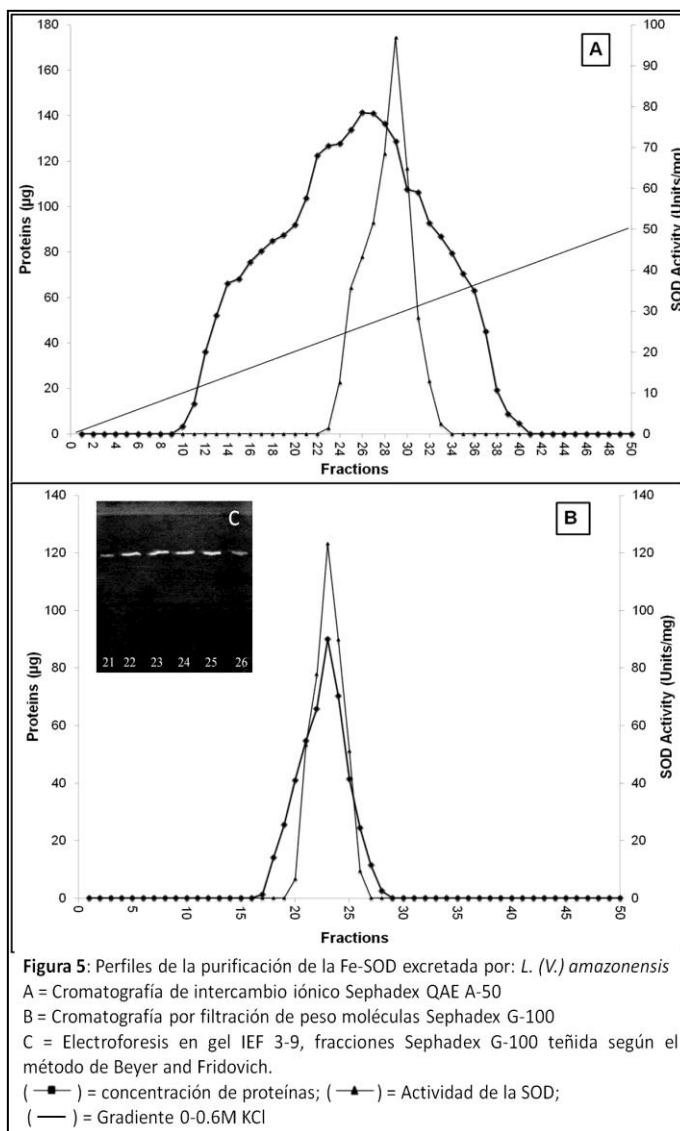
L. (V.) braziliensis entre las 20 y 30 (Fig. 3-A).



L. (V.) peruviana entre la 22 y la 31 (**Fig. 4-A**).



L. (L.) amazonensis entre las 23 y la 33 (Fig. 5-A)

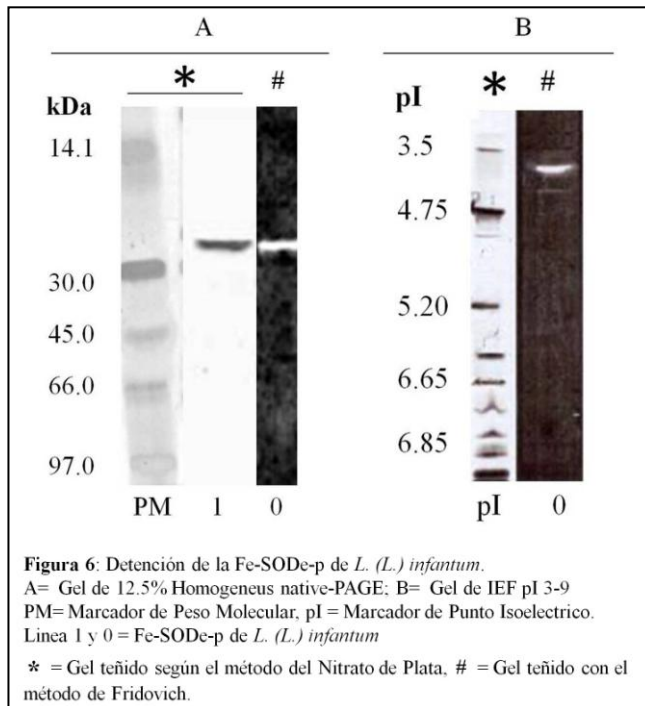


El pico Q1 recolectado, ha sido concentrado hasta un volumen final de 1ml y a una concentración final que varía en cada especie de *Leishmania* (**Tablas 2, 3, 4 y 5**) y pasado por una cromatografía de filtración por peso molecular, Sephadex G-100. De esta última, se ha obtenido un único pico de proteínas correspondiente con el pico de actividad de SOD (**Fig. 2B, 3B, 4B y 5B**).

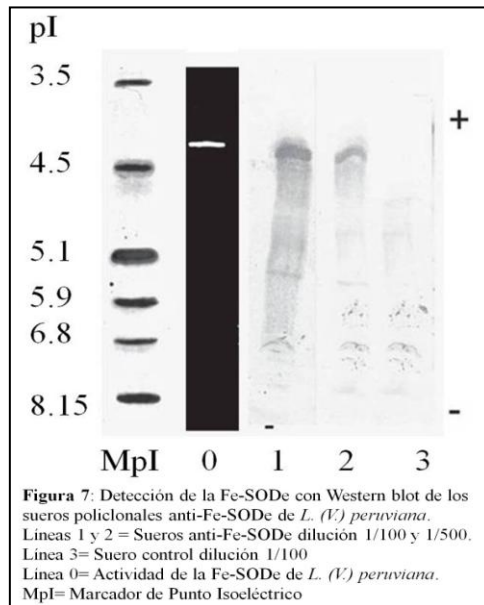
Los picos se han visualizado a través de una electroforesis de proteínas como se muestra en las **Figura 2C, 3C, 4C y 5C**.

Como se muestra en las **Tablas 2, 3, 4 y 5** hemos purificado: *L. (L.) infantum* 112.88 veces con 875.97 U/mg de actividad específica, *L. (V.) braziliensis* 123.26 veces con 893.66 U/mg de actividad específica, *L. (L.) amazonensis* 101.62 veces y 615,65 U/mg y *L. (V.) peruviana* 103.71 veces con una actividad de 630.61 U/mg.

Hemos determinado el peso molecular (PM) utilizando la electroforesis de un gel de Nativa homogéneo 12.5% revelándolo según el método del nitrato de plata descrito en el manual del PhastSystem. El gel mostraba una sola banda de alrededor de 25kDa. Así mismo determinamos el punto isoeléctrico (pI) empleando esta vez un gel de isoelectroenfoque 3-9. También en este caso visualizamos una única banda de alrededor 3.75 (Fig. 6).

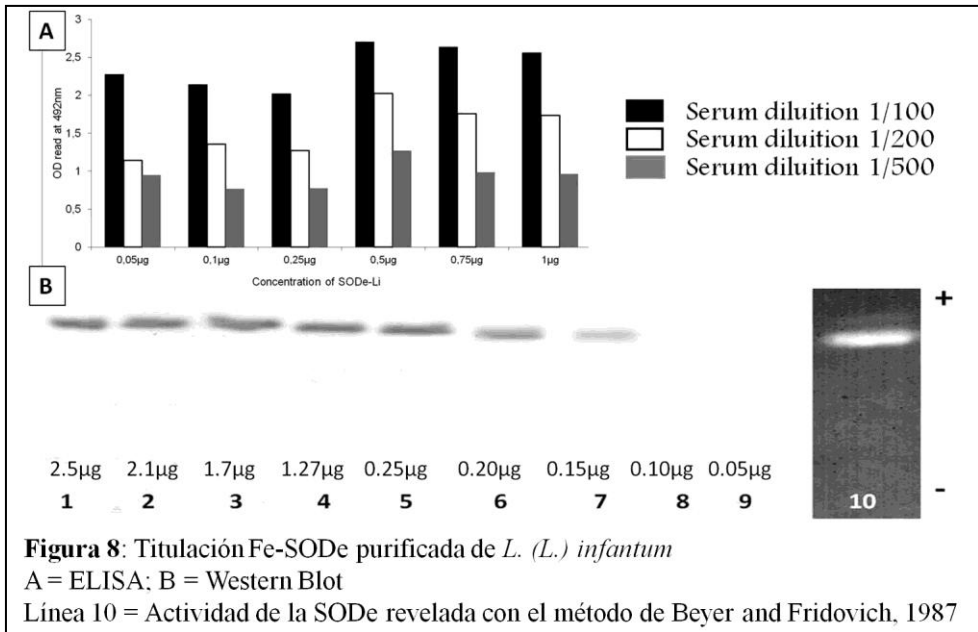


Los anticuerpos específicos frente a la banda de pI 3.75 de *L. (V.) peruviana* (Fe-SODE-Lp), obtenidos da la inmunización de ratones Balb-C mediante Western-blot y usando como fracción antigénica de la Fe-SODE demostraron la capacidad inmunogénica de la Fe-SODE (**Fig. 7**, líneas 1-2). Así, el suero control (**Fig. 7**, línea 3) la reacción es negativa a la dilución de 1/100 mientras que en el caso de suero anti-SODE-Lp (**Fig. 7**, líneas 1-2), la reacción es positiva tanto a una dilución de 1/100 como a 1/500.



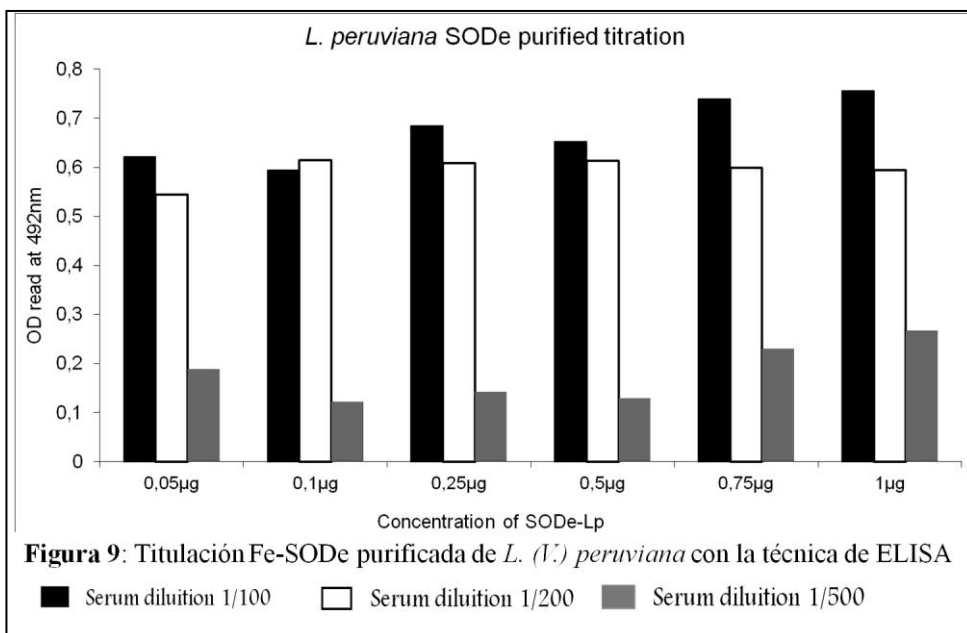
Hemos titulado la Fe-SODe purificada de *L. (L.) infantum* y de *L. (V.) peruviana* usando las técnicas de ELISA (ELISA-T) y sólo para *L. (L.) infantum* la técnica de Western blot (WB-T). Para la ELISA-T hemos empleado diferentes concentraciones de antígeno (0.05 µg, 0.1 µg, 0.25 µg, 0.5 µg, 0.75 µg y 1 µg) así como distintas diluciones del suero (1/100, 1/200 y 1/500) (**Fig. 8 y 9**). También para el WB-T hemos titulado diferentes cantidades de antígeno (0.05 µg, 0.10 µg, 0.15 µg, 0.20 µg, 0.85 µg, 1.27 µg, 1.7 µg, 2.1 µg y 2.5 µg) y una sola dilución del suero (1/80) (**Fig. 8**).

En el caso de *L. (L.) infantum* hemos empleado un suero de perro infectado procedente de Italia en el que el parásito fue detectado microscópicamente por el veterinario. Como se muestra en la **Figura 8-A** la mejor relación concentración antígeno/dilución suero en la técnica de ELISA es la de 0.05 µg antígeno y la dilución del suero 1/100. Con la técnica del Western blot, como se puede ver en la **Figura 8-B** la banda era visible hasta la concentración de 0.15 µg.



Para la titulación de la Fe-SODe purificada de *L. (V.) peruviana* hemos empleado un suero de paciente infectado procedente de Perú. Para la titulación del antígeno de *L. (V.) peruviana* adoptamos las mismas concentraciones de la titulación anteriormente descrita del antígeno de *L. (L.) infantum*.

Los resultados aquí encontrados son 100% concordantes con los encontrados en la titulación previa, siendo la mejor relación antígeno/dilución suero la de 0.05µg/ dilución 1/100 (**Fig. 9**).



Al ensayar los 213 sueros de paciente procedentes de Perú, con la técnica del IFI frente a los anticuerpos de *L. (V.) peruviana*, 73 de los 113 sueros eran positivos a una dilución de 1:40 (seroprevalencia total de 66%, **Tabla 6**). Comparando el porcentaje de positividad a la dilución 1/200, el resultado total varía desde un 7% por IFI hasta un 31%, 83%, 78%, 54% y 10% mediante ELISA con el homogenado de *L. (V.) peruviana*, con Fe-SODe de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) infantum*, respectivamente (**Tabla 6**).

Serologic tests: antigen fraction*	Serum dilution											
	SL				ACL				Total leishmaniasis			
	N° sera	1/40	1/100	1/200	N° sera	1/40	1/100	1/200	N° sera	1/40	1/100	1/200
IFA: promastigotes from <i>L. (V.) peruviana</i>	45	73%	33%	9%	68	62%	28%	6%	113	66%	30%	7%
ELISA: homogenate from <i>L. (V.) peruviana</i>	45	—†	67%	38%	68	—	59%	27%	113	—	62%	31%
ELISA: SODe-Lp	45	—	84%	67%	68	—	97%	94%	113	—	92%	83%
ELISA: SODe-Lb	45	—	—	93%	68	—	—	68%	113	—	—	78%
ELISA: SODe-La	45	—	—	69%	68	—	—	43%	113	—	—	54%
ELISA: SODe-Li	45	—	—	11%	68	—	—	9%	113	—	—	10%

Tabla 6: Seroprevalencia de los sueros de paciente con Leishmaniasis mucocutánea (SL) y cutánea andina (ACL) por las técnicas de IFA y ELISA frente a distintas fracciones antigénicas.
Fracción Antigénica: promastigotas de *L. (V.) peruviana*, homogenado (fracción H) de *L. (V.) peruviana*.
SODe-Lp = Fe-SODe no purificada de *L. (V.) peruviana*
SODe-Lb = Fe-SODe no purificada de *L. (V.) braziliensis*
SODe-La = Fe-SODe no purificada de *L. (L.) amazonensis*
SODe-Li = Fe-SODe no purificada de *L. (L.) infantum*
† = No hecho

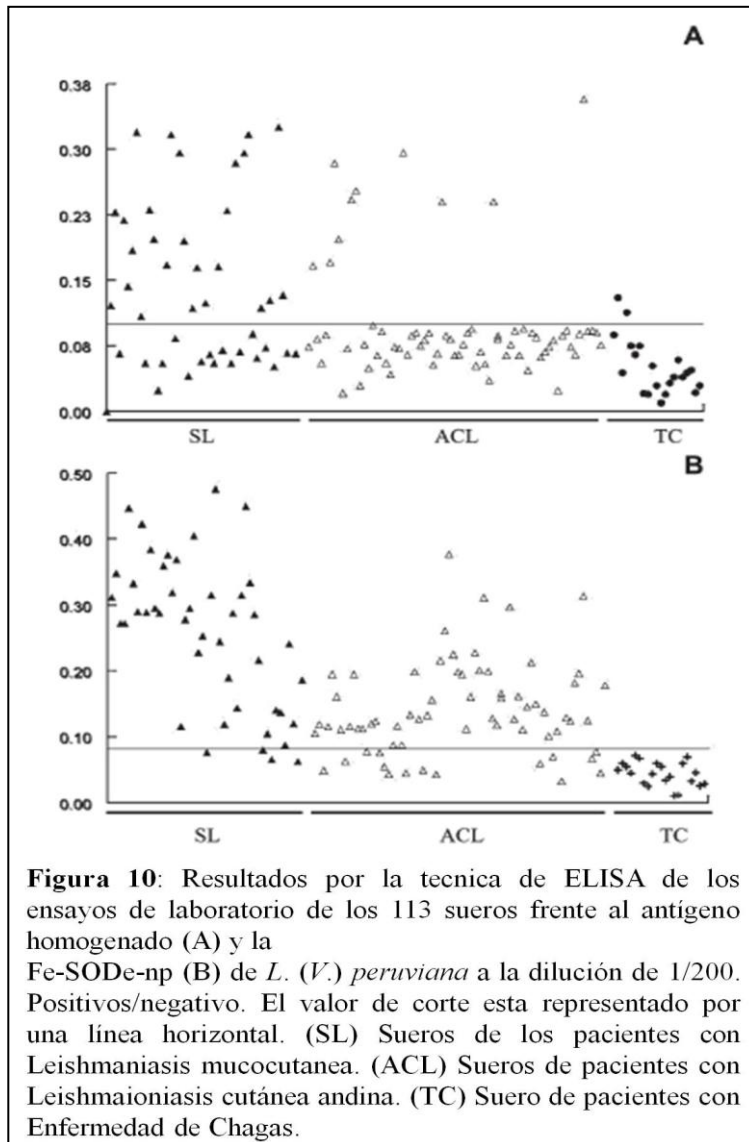
Es decir, 35 sueros dieron resultados positivos frente a la fracción de homogenado (**Fig. 10A**), mientras que, 94 sueros resultaron positivos usando como fracción antigénica la Fe-SODe-Lp-np (**Fig. 10B**). Por lo general, el análisis de los 113 sueros dio prácticamente la misma seroprevalencia cuando se usaba como fracción antigénica tanto la Fe-SODe de *L. (V.) peruviana* como de *L. (V.) braziliensis*. Por el contrario, obtuvimos una diferencia significativa cuando la fracción antigénica usada fue la Fe-SODe de *L. (L.) amazonensis*, ya que, la seroprevalencia descendió hasta un 54% a la dilución 1/200. Mientras que, cuando usamos la Fe-SODe de *L. (L.) infantum* encontramos una seroprevalencia solo del 10% (11 sueros positivos) a la misma dilución (**Tabla 6**).

Otra característica notable de la Fe-SODe de *L. (V.) peruviana* es la gran especificidad frente a los sueros de pacientes que padecen ACL comparado con las otras fracciones antigénicas (Fe-SODe-np-Lb, Fe-

SODe-np-La y Fe-SODe-np-Li). Encontramos una seroprevalencia del 97% y del 94% respectivamente a una dilución de 1/100 y 1/200, de los 68 sueros de pacientes con sintomatología cutánea (SL) 64 dieron resultados positivos, mientras que ensayándolos con la Fe-SODe-np de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y de *L. (L.) infantum* dieron positivos, respectivamente, sólo 46, 30 y 6 sueros a una dilución de 1/200 (**Tabla 6**).

Sin embargo, cuando se ensayaron los sueros de pacientes con sintomatología mucocutánea (ACL) la Fe-SODe más específica para la detección fue, como era de esperar, la Fe-SODe-np-Lb, llegando a una seroprevalencia del 93% (42 sueros positivos). Además como anteriormente se ha descrito para la Fe-SODe-np de *L. (V.) peruviana*, demostramos su especificidad por la disminución de la seroprevalencia empleando como fracciones antigénicas la Fe-SODe-np-Lp, Fe-SODe-np-La y Fe-SODe-np-Li, dando resultados de 32, 31 y 5 sueros positivos (**Tabla 6**).

Por otra parte, los mismos ensayos realizados con sueros de enfermos de Chagas frente a Fe-SODe-np-Lp y Fe-SODe-np-Lb dieron resultados negativos. Poniendo de manifiesto la posible ausencia de reacción cruzada de la fracción antigénica Fe-SODe con anticuerpos de *Trypanosoma cruzi* a una dilución de 1/200 (**Fig. 10B**).



Con el objetivo de demostrar que la Fe-SOD excretada purificada de *Leishmania* spp. puede ser un buen marcador molecular para el diagnóstico de la leishmaniasis hemos ensayado un total de 542 sueros: 155 de perros y 387 de humanos (**Tabla 7**).

	Origen	Nº Sueros	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (V) peruviana</i>
Perros	España	145	✓			
“	Italia	10	✓			
Humanos	Chile	10	✓	✓	✓	✓
“	Colombia	51		✓		✓
“	Mexico	213			✓	
“	Perú	113	✓	✓	✓	✓
	TOT	542	278	174	336	174

Tabla 7: Relación de los sueros ensayado con la Fe-SODE purificada de *Leishmania (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V) braziliensis* y *L. (V) peruviana*.

Para evaluar la eficacia de la Fe-SODE de *L. (L.) infantum* hemos ensayado 155 sueros de perros de los cuales 145 procedían de la Comunidad Autónoma Andalucía (España), eran sueros problemas y 10, procedentes de la región Lombardía (Italia). Estos sueros fueron controles positivos.

Todos los sueros han sido ensayados a una dilución de 1/80 por la técnica de ELISA y de Western blot.

Los resultados obtenidos empleando la fracción antigénica purificada han sido comparados con los resultados obtenidos empleando como antígeno el lisado celular soluble (fracción H) y la Fe-SODe-np.

Para validar los resultados, los 10 sueros controles procedentes de Italia han sido ensayados siguiendo las mismas pautas usadas para los sueros problemas. De los 10 sueros dieron positivos sólo 6 de ellos empleando la fracción H como antígeno, 9 con la Fe-SODe-np. Cuando empleamos nuestra proteína purificada los 10 sueros fueron positivos tanto a ELISA como a Western blot (**Tabla 8**).

Sueros	H	Fe-SODe-np		Fe-SODe-p	
	ELISA	ELISA	WB	ELISA	WB
Total (155)	13 (%)	43 (27.74%)	36 (23.22%)	71 (45.80%)	71 (45.80%)
España (145)	8 (5.51%)	34 (23.44%)	27 (18.62%)	61 (42.07%)	61 (42.07%)
Italia (10)	6 (60%)	9 (90 %)	9 (90%)	10 (100%)	10 (100%)

Tabla 8: Relación de los sueros de perros procedentes de España y de Italia frente a *L. (L.) infantum* por la técnica de ELISA y WB (Western blot).
H = Fracción H, Fe-SODe-np = Hierro Superóxido Dismutasa no purificada;
Fe-SODe-p = Hierro Superóxido Dismutasa purificada.

Ensayando los 145 sueros problemas procedentes de España usando como antígeno la fracción H por la técnica de ELISA solo 8 sueros fueron positivos (5.5%). Cuando se usó como antígeno la Fe-SODe-np aparecieron 34 sueros positivos (23.44%) (**Tabla 9**).

Para confirmar los resultados obtenidos por la técnica de ELISA hemos testado los sueros positivos por la técnica de Western blot. Cuando empleamos como antígeno la Fe-SODE-np sólo 27 sueros (18.62%) dieron positivos mostrando la presencia de resultados falsos positivos en la técnica de ELISA utilizando la proteína no purificada.

Cuando testamos todos los sueros usando como antígeno la SODE-

Li por la técnica de ELISA encontramos que 61 sueros (42.07%) dieron positivos (Tabla 9) y encontramos los mismos resultados por la técnica de Western-blot observando una correspondencia del 100% entre las dos técnicas.

	H		Fe-SODE-np		SODE-Li			H		Fe-SODE-np		SODE-Li	
	ELISA	WB	ELISA	WB	ELISA	WB		ELISA	WB	ELISA	WB	ELISA	WB
4	-	-	-	+	+	64	-	-	-	+	+		
5	-	-	-	+	+	65	-	+	+	+	+		
6	-	-	-	+	+	66	-	+	-	+	+		
7	-	-	-	+	+	67	-	+	+	+	+		
8	-	-	-	+	+	68	-	+	+	+	+		
9	-	-	-	+	+	69	-	+	-	+	+		
13	-	-	-	+	+	71	-	+	-	+	+		
15	-	-	-	+	+	72	-	-	-	+	+		
17	-	-	-	+	+	74	-	-	-	+	+		
18	-	-	-	+	+	77	-	-	-	+	+		
22	-	+	+	+	+	80	-	-	-	+	+		
23	-	+	-	-	-	82	-	-	-	+	+		
25	-	+	+	+	+	83	-	+	+	+	+		
29	-	+	+	+	+	85	-	-	-	+	+		
32	-	+	-	-	-	86	-	-	-	+	+		
33	-	+	+	-	-	87	-	-	-	+	+		
34	-	+	+	-	-	89	-	-	-	+	+		
37	-	-	-	-	-	93	+	+	-	-	-		
38	+	+	+	+	+	94	-	-	-	+	+		
42	-	+	+	-	-	95	-	-	-	+	+		
44	-	+	+	+	+	96	-	-	-	+	+		
47	-	+	+	+	+	97	-	-	-	+	+		
49	-	+	+	+	+	98	-	+	+	-	-		
50	-	+	+	+	+	100	-	-	-	+	+		
51	-	+	+	+	+	101	-	-	-	+	+		
52	-	+	+	+	+	108	-	+	+	+	+		
53	-	+	+	+	+	109	-	-	-	+	+		
54	-	+	+	+	+	111	-	-	-	+	+		
55	-	-	-	+	+	115	+	-	-	-	-		
56	-	+	+	+	+	116	-	-	-	+	+		
57	-	+	+	+	+	117	-	-	-	+	+		
59	-	+	-	+	+	120	-	-	-	+	+		
60	+	+	+	+	+	122	+	-	-	-	-		
61	-	+	+	+	+	125	+	-	-	+	+		
62	+	+	+	+	+	126	+	-	-	-	-		
63	-	+	+	+	+	128	-	-	-	+	+		
						8	34	27	61	61			

Tabla 9: Relación de los sueros de perros procedentes de la Comunidad Autónoma Andalucía positivos a *Leishmania (L.) infantum* por la técnica de ELISA y Western blot (WB).
Fracción antigénica: lisado celular soluble (H), Hierro Superóxido Dismutasa excretada no purificada (Fe-SODE-np) y Hierro Superóxido Dismutasa excretada purificada (SODE-Li)

Con el objetivo de demostrar que la Fe-SODe purificada es un buen marcador molecular también para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en humanos, hemos ensayado 51 sueros de pacientes con lesiones cutáneas causadas por *Leishmania* spp. procedentes de Bogotá (Colombia), y 213 sueros problemas de humanos de México: 81 del Estado de Hidalgo y 132 del Estado de Nuevo León.

Los 51 sueros de Colombia, han sido ensayados con las técnicas de ELISA y Western blot a una dilución de 1/200 usando como fracción antigénica el lisado celular soluble (fracción H), la Fe-SODe no purificada y la Fe-SODe purificada de *L. (L.) amazonensis* y de *L. (V.) peruviana*.

Cuando ensayamos los 51 sueros usando como antígeno la fracción H de *L. (V.) peruviana*, 11 sueros dieron positivos (21.58%) mientras que al emplear la fracción H de *L. (L.) amazonensis* dieron positivos 29 sueros (56.86%). Cuando usamos como antígeno la Fe-SODe no purificada de *L. (V.) peruviana* sólo 10 sueros dieron positivos (19.60%) mientras que con la Fe-SODe-np de *L. (L.) amazonensis* dieron positivos 37 sueros (72.54%) (**Tabla 10**).

Cuando empleamos como fracción antigénica la proteína purificada encontramos 42 sueros (82.35%) positivos a *L. (L.) amazonensis* y sólo 6 sueros (11.76%) positivos a *L. (V.) peruviana* (**Tabla 10**).

Usando como antígeno la Fe-SODe purificada de las dos especie de *Leishmania* (SODe-Lp y SODe-La) hemos encontrado los mismos resultados en las dos técnicas: ELISA y Western blot (**Tabla 10**).

<i>L. amazonensis</i>															
SODe-				SODe-				SODe-				SODe-			
H		np		SODe-p		H		np		SODe-p		H		np	
Sera	E	E	E/WB	Sera	E	E	E/WB	Sera	E	E	E/WB	Sera	E	E	E/WB
1	-	+	+	14	+	+	+	27	-	+	-	40	+	+	+
2	+	+	+	15	-	-	+	28	-	-	+	41	+	+	+
3	-	-	-	16	-	-	+	29	-	+	-	42	+	+	+
4	+	+	+	17	+	+	+	30	+	+	+	43	+	+	+
5	+	+	+	18	-	-	+	31	+	+	+	44	+	+	+
6	+	+	+	19	+	+	+	32	+	-	-	45	+	+	+
7	-	-	+	20	-	-	-	33	-	-	+	46	-	+	+
8	+	+	+	21	-	-	-	34	+	+	+	47	+	+	+
9	+	+	+	22	+	+	+	35	+	+	+	48	+	+	+
10	-	+	+	23	+	+	+	36	-	-	-	49	+	+	+
11	+	+	+	24	+	+	+	37	-	+	+	50	+	+	+
12	-	+	+	25	+	+	+	38	-	-	-	51	-	+	+
13	-	-	+	26	-	+	+	39	-	-	-				
<i>L. peruviana</i>															
H		SODe- np		SODe-p		H		SODe- np		SODe-p		H		SODe- np	
Sera	E	E	E/WB	Sera	E	E	E/WB	Sera	E	E	E/WB	Sera	E	E	E/WB
1	-	-	-	14	-	+	-	27	-	-	-	40	-	-	+
2	+	-	-	15	-	-	-	28	-	-	-	41	+	+	+
3	-	-	-	16	-	-	-	29	-	-	-	42	+	+	-
4	-	-	-	17	-	-	-	30	+	-	-	43	+	-	-
5	-	-	-	18	-	-	-	31	-	-	-	44	+	+	-
6	-	-	-	19	-	-	-	32	-	-	-	45	+	+	+
7	-	-	-	20	-	-	-	33	-	-	-	46	-	-	-
8	+	+	+	21	-	-	-	34	-	-	-	47	-	+	-
9	-	-	-	22	+	+	+	35	-	-	-	48	-	-	-
10	-	-	-	23	-	-	-	36	-	-	-	49	+	+	+
11	-	-	-	24	+	-	-	37	-	-	-	50	-	-	-
12	-	-	-	25	-	-	-	38	-	-	-	51	-	-	-
13	-	-	-	26	-	-	-	39	-	-	-				

Tabla 10: Relación de los sueros de pacientes procedente de Colombia positivos a *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* y *L.* (*V.*) *peruviana* por la técnica de ELISA (E) y Western blot (WB).
Fracción antigénica: lisado celular soluble (H), Hierro Superóxido Dismutasa excretada no purificada (SODe-np) y Hierro Superóxido Dismutasa excretada purificada (SODe-p)

El total de 213 sueros de humanos procedentes de México, 81 procedentes de la ciudad de Pachuca, Estado de Hidalgo y 132 de la ciudad de Monterrey, Estado de Nuevo León, han sido ensayado por la técnica de ELISA y Western blot usando como fracciones antigénicas la Fe-SODe no purificada y la Fe-SODe purificada de *L. (V.) braziliensis*.

Al ensayar los 213 sueros empleando como antígeno la SODe-np-Lb, 63 sueros (29.57%) dieron positivos, 52 procedentes de Monterrey (39.39%) y 19 de Pachuca (23.45%). Al utilizar la SODe-Lb como antígeno 38 sueros dieron positivo (17.84%) 3 procedentes de Pachuca (3.70%), 35 (26.51%) procedentes de Monterrey (**Tabla 11**).

Con el objetivo de demostrar que la Fe-SODe purificada es mucho más sensible que la misma enzima no purificada, hemos vuelto a ensayar los 213 sueros mexicano por la técnica de ELISA empleando 0.05µg de enzima purificada, o sea 10 veces menor cantidad, y los resultados encontrados corresponden completamente con los resultados obtenidos al usar 0.5µg de proteína purificada (**Tabla 11**).

Todos los sueros positivos a la técnica de ELISA empleando como antígeno la Fe-SODe purificada han sido ensayados con la técnica de Western blot. El 100% de los sueros dieron positivos, confirmando una correspondencia completa entre las dos técnicas (**Tabla 11**).

Tabla 11.

	ELISA				WB	ELISA				WB	ELISA				WB				
	Np	P			P	Np	P			P	Np	P			P				
	1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,5µg		1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,5µg		1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,5µg					
Monterrey																			
1	-	-	-	-	34	-	-	-	-	67	+	-	-	-	100	-	-	-	-
2	+	-	-	-	35	-	-	-	-	68	-	-	-	-	101	-	-	-	-
3	+	-	-	-	36	+	-	-	-	69	-	-	-	-	102	-	-	-	-
4	+	+	+	+	37	-	-	-	-	70	+	-	-	-	103	-	-	-	-
5	+	+	+	+	38	+	-	-	-	71	+	-	-	-	104	-	-	-	-
6	-	+	+	+	39	-	-	-	-	72	-	-	-	-	105	-	-	-	-
7	+	+	+	+	40	-	-	-	-	73	-	-	-	-	106	-	-	-	-
8	-	+	+	+	41	+	-	-	-	74	+	-	-	-	107	-	-	-	-
9	+	+	+	+	42	+	-	-	-	75	+	+	+	+	108	-	-	-	-
10	+	+	+	+	43	-	-	-	-	76	+	-	-	-	109	-	-	-	-
11	+	+	+	+	44	-	-	-	-	77	-	-	-	-	110	-	-	-	-
12	-	+	+	+	45	+	-	-	-	78	+	-	-	-	111	-	-	-	-
13	-	-	-	-	46	+	-	-	-	79	-	-	-	-	112	-	-	-	-
14	-	-	-	-	47	-	-	-	-	80	+	-	-	-	113	-	-	-	-
15	-	-	-	-	48	-	-	-	-	81	+	-	-	-	114	-	+	+	+
16	-	-	-	-	49	-	-	-	-	82	+	-	-	-	115	-	-	-	-
17	-	-	-	-	50	-	-	-	-	83	+	-	-	-	116	-	-	-	-
18	-	+	+	+	51	-	-	-	-	84	+	+	+	+	117	-	+	+	+
19	+	+	+	+	52	-	-	-	-	85	-	+	+	+	118	-	-	-	-
20	+	+	+	+	53	+	+	+	+	86	-	-	-	-	119	-	-	-	-
21	+	+	+	+	54	+	-	-	-	87	+	+	+	+	120	-	+	+	+
22	-	+	+	+	55	-	-	-	-	88	-	-	-	-	121	-	+	+	+
23	+	+	+	+	56	-	-	-	-	89	+	-	-	-	122	-	-	-	-
24	-	+	+	+	57	+	-	-	-	90	+	-	-	-	123	-	-	-	-
25	-	+	+	+	58	-	-	-	-	91	+	-	-	-	124	-	+	+	+
26	+	+	+	+	59	-	-	-	-	92	-	-	-	-	125	-	+	+	+
27	-	+	+	+	60	+	-	-	-	93	-	-	-	-	126	-	-	-	-
28	+	+	+	+	61	+	-	-	-	94	-	-	-	-	127	-	-	-	-
29	+	-	-	-	62	+	-	-	-	95	-	-	-	-	128	-	-	-	-
30	-	-	-	-	63	+	+	+	+	96	-	-	-	-	129	-	-	-	-
31	-	-	-	-	64	+	-	-	-	97	-	-	-	-	130	-	+	+	+
32	+	-	-	-	65	+	-	-	-	98	-	-	-	-	131	-	+	+	+
33	+	-	-	-	66	+	-	-	-	99	-	-	-	-	132	-	+	+	+

	ELISA				WB	ELISA				WB	ELISA				WB				
	Np		P		P	Np		P		P	Np		P		P	Np		P	
	1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,05µg	0,5µg	1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,05µg	0,5µg	1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,05µg	0,5µg	1,5µg	0,5µg	0,05µg	0,05µg
Pachuca																			
1	-	-	-	-	22	-	-	-	-	42	-	-	-	-	62	-	-	-	-
2	+	-	-	-	23	-	-	-	-	43	-	-	-	-	63	-	-	-	-
3	+	+	+	+	24	-	-	-	-	44	-	-	-	-	64	+	-	-	-
4	-	-	-	-	25	-	-	-	-	45	+	-	-	-	65	+	-	-	-
5	-	-	-	-	26	+	-	-	-	46	-	-	-	-	66	-	-	-	-
6	-	-	-	-	27	-	-	-	-	47	-	-	-	-	67	-	-	-	-
7	-	-	-	-	28	-	+	+	+	48	-	-	-	-	68	-	-	-	-
8	-	-	-	-	29	-	-	-	-	49	-	-	-	-	69	-	-	-	-
9	-	-	-	-	30	-	-	-	-	50	-	-	-	-	70	-	-	-	-
10	-	-	-	-	31	-	-	-	-	51	-	-	-	-	71	-	-	-	-
11	-	-	-	-	32	-	-	-	-	52	-	-	-	-	72	-	-	-	-
12	-	-	-	-	33	-	-	-	-	53	-	-	-	-	73	-	-	-	-
13	+	+	+	+	34	-	-	-	-	54	-	-	-	-	74	-	-	-	-
14	-	-	-	-	35	+	-	-	-	55	-	-	-	-	75	-	-	-	-
15	+	-	-	-	36	-	-	-	-	56	-	-	-	-	76	-	-	-	-
16	+	-	-	-	37	-	-	-	-	57	-	-	-	-	77	-	-	-	-
17	-	-	-	-	38	-	-	-	-	58	-	-	-	-	78	-	-	-	-
18	-	-	-	-	39	-	-	-	-	59	-	-	-	-	79	-	-	-	-
19	-	-	-	-	40	-	-	-	-	60	-	-	-	-	80	-	-	-	-
20	-	-	-	-	41	+	-	-	-	61	-	-	-	-	81	-	-	-	-
21	-	-	-	-															

Tabla 11: Relación de los sueros de pacientes procedentes de Monterrey, Estado de Nuevo León y de Pachuca, Estado de Hidalgo, México positivos a *Leishmania (L.) braziliensis* por la técnica de ELISA y Western blot (WB).

Fracción antigénica: Hierro Superóxido Dismutasa excretada no purificada (NP) y Hierro Superóxido Dismutasa excretada purificada (P)

Con el objetivo de demostrar que la Fe-SODE purificada no presenta reacción cruzada entre diferentes especies de *Leishmania* ni con otros protozoos como es el caso de *Trypanosoma cruzi*, hemos vuelto a ensayar los 113 sueros de pacientes procedentes de Perú y los 10 sueros de pacientes chagasicos procedentes de Chile (**Tabla 12**).

Todos los sueros fueron ensayados por la técnica de ELISA empleando como fracción antigénica las 4 proteínas purificadas a una concentración de 0.05µg, cada una por separado.

Empleando la Fe-SODE- purificada de *L. (V.) peruviana* 105 sueros nos dieron positivos (93%) y 70 sueros nos dieron positivo (79.10%) a *L. (V.) braziliensis*. Separando el grupo de los 113 sueros por las manifestaciones clínicas, ACL y SL, encontramos que de los 68 pacientes con SL, 38 dieron positivo a *L. (V.) peruviana* (46.66%) y 44 dieron positivo a *L. (V.) braziliensis* (97%). De los 45 pacientes con manifestaciones mucocutáneas, ACL, sólo 26 sueros dieron positivos a *L. (V.) braziliensis* (38.23%) mientras que 67 sueros (99%) dieron positivos a *L. (V.) peruviana*. (**Tabla 12**).

Cuando ensayamos los 113 sueros con la Fe-SODE purificada de *L. (L.) infantum* y de *L. (L.) amazonensis* observamos, respectivamente 7 sueros positivos (6.9%) y 35 sueros (30.97%). Ensayando con las 4

proteínas purificadas, por separado, los 10 sueros procedentes de Chile, ningún suero dio positivo, obteniendo un 100% de negativos (**Tabla12**).

		SL (45)	ACL (68)	Total (113)	TC (10)
Fe-SDOe-Lp	p	46.66%	99%	93%	0%
	np	67%	94%	83%	0%
Fe-SODe-Lb	p	97%	38.23%	79.10%	0%
	np	93%	68%	78%	---
Fe-SODe-La	p	8.1%	11.56%	30.97%	0%
	np	69%	43%	54%	---
Fe-SODe-Li	p	1.19%	2.40%	6.9%	0%
	np	11%	9%	10%	---

Tabla 12: Seroprevalencia de los sueros de paciente con Leishmaniasis mucocutánea (SL) y cutánea andina (ACL) y enfermedad de Chagas (TC) por la técnica de ELISA.

Fracción antigénica: Fe-SODe = Hierro Superoxido Dismutasa excretada

Lp = *Leishmania (V.) peruviana*; Lb = *Leishmania (V.) braziliensis*;

La = *Leishmania (L.) amazonensis*; Li = *Leishmania (L.) infantum*; p = purificada;

np = no purificada; () = numero sueros

Discusión

6. Discusión

El Oxígeno como elemento fue descubierto por Joseph Priestley en 1774, cuando enfocando los rayos del sol sobre óxido mercuríco, recogió el oxígeno puro que se desprendía. Priestley no sólo especuló las posibles aplicaciones médicas del oxígeno puro sino también la probable toxicidad biológica.

Hoy en día sabemos que todos los organismos aeróbicos se ven afectados por la situación paradójica de que el oxígeno, fuente de su existencia, también es una sustancia tóxica por lo que han desarrollado mecanismos de defensa elaborados para poder sobrevivir. Los organismos anaeróbicos, que no poseen estos mecanismos de defensa con la sola exposición al oxígeno mueren.

El Oxígeno molecular es muy importante para los organismos en cuanto regula el crecimiento, la diferenciación y la energía celular; por lo que resulta ser indispensable para las células que obtienen de la energía química (ATP) necesaria para todas sus funciones [Taoufiq et al., 2006].

Aunque sea de vital importancia para la célula, el oxígeno molecular puede ser transformado en formas altamente tóxicas: ROS (Especies reactivas del oxígeno o radicales libres).

Los radicales libres se producen de manera endógena a consecuencia del metabolismo mitocondrial [Evans y Halliwell, 2001; Gilbert, 2000].

Durante la reacción de reducción de una molécula de oxígeno a agua se forman tres tipos de intermediarios: el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-).

El ion superóxido se forma principalmente durante la reducción del oxígeno, sin embargo se conocen otras reacciones que dan lugar a este ion en cantidad substancial como el caso de las autooxidaciones de:

Citocromo C reducido [Casell and Fridovich, 1975]

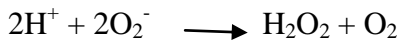
Fenoles polihidricos [Marklund and Marklund, 1974]

Hidroquinona [Mirsa and Fridovich, 1972]

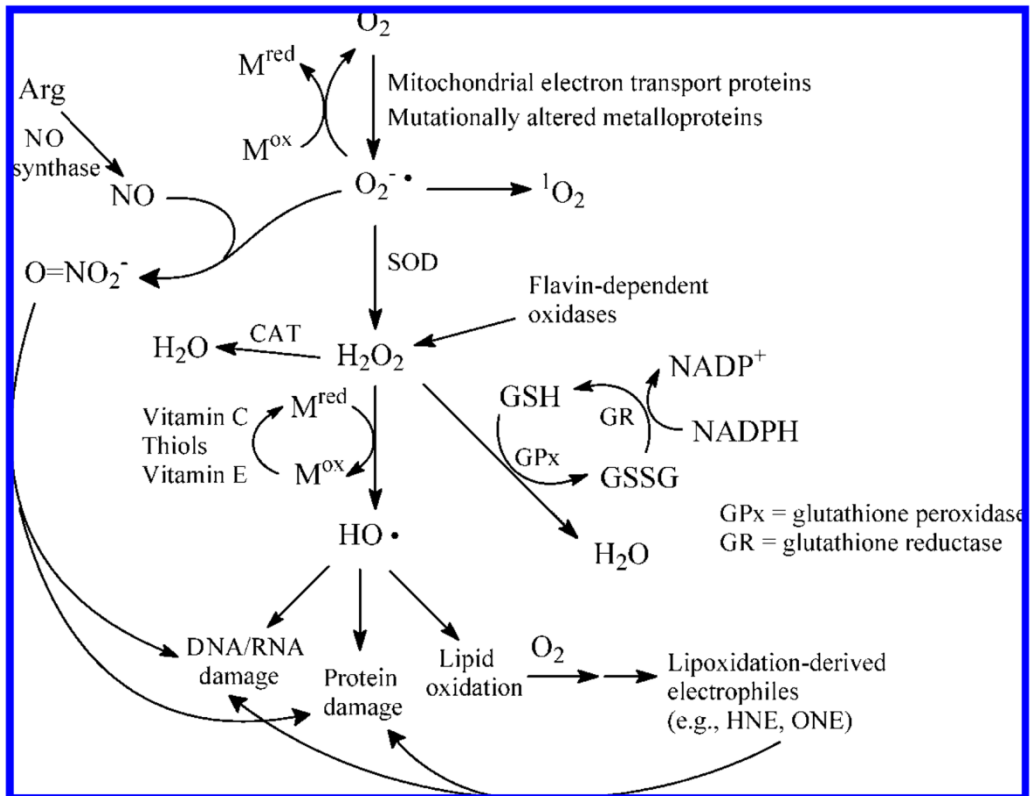
En ocasiones, los radicales libres se forman como respuesta de los organismos superiores frente a ciertos agentes infecciosos. Después de la activación de los macrófagos debido a la presencia de un agente patógeno, se pueden observar diferentes procesos celulares como la degradación fagolisosomal, la generación de ROS y del Óxido nítrico (NO) produciéndose, de esta forma, la fagocitosis y la eliminación del huésped no deseado [Van Assche et al., 2011].

Además en la naturaleza encontramos muchas fuentes externas de radicales libres (por ejemplo: el humo del tabaco, el CO₂ industrial, los pesticidas o las radiaciones ultravioletas).

La dismutación del radical superóxido es llevada a cabo por la superóxido dismutasa que cataliza la reacción:



[Fridovich, 1989; McCord and Fridovich, 1988]



Sayre et al. *Chem. Res. Toxicol.*, Vol. 21, No. 1, 2008

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 en eritrocitos bovinos. En realidad, una vez caracterizada esta enzima resultó ser idéntica a las llamadas cupreinas, metaloproteínas aisladas y caracterizadas treinta años antes pero sin actividad catalítica demostrada.

En 1981, después de haber comprobado que la SOD intervenía en la respuesta celular frente a infecciones e inflamaciones, Meshnick y Eaton proponen el papel potencial de estas enzimas en la modulación de las reacciones inmunológicas [Meshnick and Eaton, 1981]. En 1987 aun no se conocía con exactitud el papel que esta enzima desempeñaba en la reacción hospedador-parasito, sin embargo todos los datos, hasta aquel momento recogidos, indicaban que podía estar involucrada en un mecanismo de evasión frente a los leucocitos del hospedador, además de servir como mecanismo de detoxificación de los metabolitos del oxígeno [Garcia-Ruiz Rubio, 1987].

Desde entonces se han realizado muchos estudios que nos han ayudado a avanzar en el conocimiento de esta enzima.

En la naturaleza encontramos 4 tipos de SOD: Cu/Zn-SOD presente en los organismos eucariotas y en bacterias, Mn-SOD presente en los organismos procariotas y en las matrices mitocondriales de los eucariotas, Ni-SOD descrita en algunas especies de *Streptomyces* y Fe-

SOD presente en organismos procariotas, en cloroplastos de algunas plantas o algas y en protozoos [Wintjens et al., 2004; Youn et al., 1996].

Las ROS y sus efectos tóxicos han sido estudiadas detenidamente tanto para proteger a las células de ellas, como una ayuda en la defensa y en la eliminación de agentes patógenos.

Recientemente se ha reconocido que la SOD, importante defensa contra las ROS, está directamente involucrada en la generación de diferentes enfermedades. La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) puede estar causada, entre otras, por una mutación en el gen C9ORF72 que codifica la SOD-1 [Graffmo et al., 2013; Andersen et al., 2011]. La SOD tiene un gran poder neuroprotector por lo que se ve involucrada también en otras enfermedades neuronales como el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington [Murakami et al., 2011; Sayre et al., 2008; Barnham et al., 2004].

En estudios de laboratorio, empleando ratones SOD1 Knock out se observó la generación de diferentes enfermedades como: osteoporosis [Nojiri et al., 2011], infertilidad [Noda et al., 2012], carcinoma hepático [Elchuri et al., 2005] y atrofia muscular [Muller et al., 2006].

La presencia de la SOD como defensa, se ha encontrado también en otros organismos. Las SODs presentes en parásitos, agentes patógenos de grande enfermedades, tanto para la población humana como para otros animales, de compañía o de ganadería, han sido objeto de muchos estudios

quimioterapéuticos, siendo una diana muy atractiva ya que su inhibición llevaría a la muerte del parásito por parte de las ROS producidas por los macrófagos [Wilson et al. 1994; Meshnick and Eaton 1981]

La Fe-SOD se ha identificado en varios protozoos como: *Plasmodium* spp. [Dive et al., 2003], *Acanthamoeba castellanii* [Kim et al., 2012], *Entamoeba histolytica* [Tannich et al., 1991], *Toxoplasma gondii* [Brydges et al., 2003], *Perkinsus marinus* [Schott et al., 2003], *Trichomonas vaginalis* [Viscogliosi et al., 1998].

También en la familia de los trypanosomatidos la Fe-SOD ha sido identificada y estudiada en muchos miembros de esta. *Crithidia fasciculata* que presenta tres isoformas [Le Trant et al., 1983], *Phytomonas* aisladas en *Euphorbia characias* que presenta dos isoformas [Marin et al., 2004], *Trypanosoma cruzi* (cepa Maracay) [Mateo et al., 2008] y *Trypanosoma brucei* [Dufernez et al., 2006] que presentan cuatro isoformas.

La Fe-SOD ha sido identificada también en *Leishmania* spp. [Docampo, 1995], el número de isoformas varía entre las diferentes especies. *L. (V.) peruviana* presenta cuatro isoformas mientras que *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis* presentan 5 isoformas.

Se ha demostrado que la isoforma extracelular de la SOD es la más importante y desempeña un papel muy importante en la patogénesis de muchas enfermedades pulmonares, neuronales y cardiovasculares [Suliman et al., 2001; Fukai et al., 2002].

La isoforma extracelular de la SOD ha sido identificada en algunos vertebrados como el *Collinectes sapidus* [Brouwer et al., 2003] y en diferentes invertebrados, como en los nemotados *Burghia pahangi* [Tang et al., 1994], *Pncocherca volvulus* [James et al., 1994] y *Caenorhabditis elegans* [Fujii et al., 1998].

En 2004 Marín y colaboradores, a través de una titulación con digitonina de la Fe-SOD presente en *Phytomonas* spp., vieron la posibilidad de que una de las dos isoformas se encontrase en la membrana o fuese excretada al medio [Marín et al., 2004]. En 2006 los mismos autores demostraron y describieron por primera vez la isoforma de la Fe-SOD excretada por los parásitos protozoos de los géneros *Phytomonas* aislados en *Lycopersicon esculentom* y en *Euphorbia characias* después de haber dejado el cultivo en medio Grace sin suero durante 24 horas. La Fe-SOD excretada al medio por *Phytomonas* spp. fue caracterizada por los mismos autores y describiendo su punto isoeléctrico (pI) alrededor de 3.6 y su peso molecular (PM) alrededor de 22kDa [Marín et al., 2006]. La Fe-SOD excretada por *Phytomonas* spp. ha sido posteriormente ensayada en estudio inmunológico, analizando muestras de tomates infectado en laboratorio demostrando así su inmunogenicidad [Marín et al., 2006].

Mateo y colaboradores en el 2008 purificaron y caracterizaron cuatro isoformas de SOD presentes en *T. cruzi*, una de ellas, llamada por los autores SOD IV presentaba características bioquímicas similares a las

encontradas en la Fe-SOD excretada por *Phytomonas* spp. (Punto isoeléctrico alrededor de 3.8 y peso molecular alrededor de 25kDa) [Mateo et al., 2008]. Posteriormente los mismos autores han demostrado que la SOD IV de *T. cruzi* era una isoforma excretada por el parásito en el medio y que, como se observó con la Fe-SODE de *Phytomonas* spp., presentaba también características inmunogénicas [Mateo et al., 2010].

La actividad de la SOD en diferentes especies de parásito del género *Leishmania* ha sido demostrada por diferentes autores: *L. (L.) aethiopica* [Dufernez et al., 2006; Wilkinson et al., 2006], *L. (L.) infantum* (*syn. chagasi*) [Genetu et al., 2006], *L. (L.) donovani* [Paramchuk et al., 1997]. En 2007 Marín y colaboradores describieron la presencia de una Fe-SOD excretada por *L. (L.) infantum* y demostraron su inmunogenicidad ensayando 39 sueros de perros procedentes de las regiones de Madrid y de Granada [Marín et al., 2007].

En esta memoria de tesis doctoral hemos descrito por primera vez: la presencia de la Fe-SOD excretada al medio por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* y de sus características inmunogénicas, demostrando además que esta enzima es mucho más sensible que otros antígenos como el lisado celular utilizado en la técnica de la ELISA y de otros métodos convencionales como el IFI.

Mediante la purificación de la Fe-SODE de las cuatro especies de *Leishmania* [*L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) peruviana* y *L.*

(*V. braziliensis*) también hemos demostrado que esta proteína es mucho más sensible que la misma no purificada y que no presentan reacción cruzada con diferentes especies de *Leishmania* ni con otros trypanosomatidos como *T. cruzi*.

El diagnóstico de la leishmaniasis se realiza siguiendo un criterio clínico, mediante la identificación de los parásitos por observación directa en muestras de aspirados de tejidos o por medio de pruebas serológicas. La observación microscópica del parásito aunque sea la más específica no es suficientemente sensible dependiendo de la experiencia del clínico que observa la muestra.

El principal problema de los métodos serológicos, como hemos dicho anteriormente, es la escasa especificidad de la preparación antigénica. [Hernández-Chinea, 2007; Silva da et al., 2006; De Souza-Dias et al., 2005; Romero et al., 2004; Ryan et al., 2002]. Los kits comerciales, aceptados por la OMS, todavía no son capaces de distinguir entre las diferentes especies de *Leishmania*, por lo que, para determinar esto último se suele llevar a cabo una PCR [WHO, 2010], técnica demasiado cara y no alcanzable en países en vía de desarrollo donde la leishmaniasis humana es endémica. Por lo tanto, dada la gran implicación terapéutica de un diagnóstico tardío e incorrecto, urge desarrollar un ensayo de laboratorio preciso que confirme el diagnóstico clínico, evitando al paciente de ser

sometido a tratamiento con antimoniales inútilmente [Quijada y col., 1998].

En *Phytomonas* spp., *T. cruzi* y en *L. (L.) infantum* se ha demostrado que la Fe-SODe presenta características inmunogénicas, y empleándose como antígeno en la técnica del Western blot ha demostrado una alta sensibilidad detectando anticuerpos específicos en sueros a una dilución de 1/500 [Marín et al., 2007; Villagrán et al., 2005; Marín et al., 2004].

Como primer paso de este trabajo de tesis doctoral hemos identificado la actividad de la Fe-SOD excretada al medio de cultivo por promastigotas de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* y hemos confirmado la presencia de Fe-SOD excretada por *L. (L.) infantum* ya descrita por nuestro grupo anteriormente [Marín et al., 2007]. La actividad de esta proteína se ha visto como una única banda de pI alrededor de 4.0 en gel de poliacrilamida IEF 3-9. Infectando experimentalmente ratones Balb-C con *L. (L.) peruviana* hemos obtenidos anticuerpos policlonales que, ensayados con la técnica de Western blot, mostraron la inmunogenicidad de la Fe-SOD excretada por los parásitos.

Una vez demostrada la presencia de actividad de la Fe-SOD excretada por estos parásitos y su inmunogenicidad, hemos diseñado una ELISA experimental basada en el empleo de la Fe-SOD excretada por

promastigotas de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) infantum* como antígeno.

Comparando los resultados de nuestra ELISA experimental con los obtenidos por el método convencional del IFI y la técnica de ELISA empleando como antígeno la fracción H (ELISA-H) frente solo a *L. (V.) peruviana* hemos observado la mayor sensibilidad de la ELISA experimental respecto a las otras dos técnicas.

A una dilución de 1/200 sólo nuestra ELISA experimental dio el 83% de positividad. Mucho más baja han sido las seroprevalencias encontradas con el IFI (7%) y con la ELISA-H (31%) confirmando de esta forma la alta sensibilidad de la Fe-SODe ya demostrada por Marín y colaboradores [Marín et al., 2007].

En países donde son endémicas más de una especie de *Leishmania*, el diagnóstico diferencial entre especies se hace indispensable [WHO, 2010]. Las dos formas principales de leishmaniasis encontradas en Perú son la “Uta” o Leishmaniasis Cutánea Andina (ACL) con manifestaciones cutáneas causadas por *L. (V.) peruviana* y la “Espundia” o Leishmaniasis Selvática (SL) con manifestaciones mucocutaneas causada por *L. (V.) braziliensis* [Ferreira et al., 2003].

Analizando nuestros datos separando los sueros por manifestaciones clínicas (SL y ACL) vemos que de los 45 sueros de paciente con SL el 93% eran positivos a *L. (V.) braziliensis* y sólo el 67%

a *L. (V.) peruviana*. Analizando los 68 sueros de pacientes con ACL, el 94% de los sueros fueron positivos a *L. (V.) peruviana* y sólo el 68% a *L. (V.) braziliensis* demostrando una mayor especificidad de ambas proteínas.

Los resultados encontrados en esta primera fase están de acuerdo con anteriores descubrimientos que mostraban que la sensibilidad y la especificidad del método de diagnóstico dependía del tipo, fuente y pureza del antígeno empleado, debido a que algunos antígenos de *Leishmania* poseen epítomos comunes que crean reacciones cruzadas con otros microorganismos, en particular con *Trypanosoma*, *Mycobacteria*, *Plasmodia* y *Schistosoma*, entre otros [Kar, 1995].

Hemos también demostrado que la Fe-SODe es especie-específica, al ensayar los 113 sueros de Perú con la Fe-SOD excretada por *L. (L.) amazonensis* hemos encontrado el 54% de positividad y sólo el 10% de positivos frente a la Fe-SODe de *L. (L.) infantum*.

Las fracciones antigénicas de todas las especies de *Leishmania* han sido preparadas bajo las mismas condiciones técnicas, por lo tanto los bajos valores de prevalencia de *L. (L.) infantum* y *L. (L.) amazonensis* sugieren la ausencia de reacción cruzada entre diferentes especies de *Leishmania*.

Con el objetivo de excluir una posible reacción cruzada con *Trypanosoma cruzi*, hemos ensayado 10 sueros de enfermos chagasicos procedentes de Chile, país en el que, de acuerdo con la OMS, la

leishmaniasis está totalmente ausente, sólo empleando la Fe-SODe de *L. (L.) peruviana*. Mientras que empleando como antígeno la fracción H sólo el 80% de los sueros dieron negativos, al emplear la Fe-SODe dieron negativos la totalidad de estos. Los resultados aquí mostrados nos hicieron postular la posible ausencia de reacción cruzada con otros Trypanosomatidos.

La ausencia de una reacción cruzada con la enfermedad de Chagas es muy importante por el hecho de que las aéreas endémicas de ambas enfermedades están solapadas, lo que ocasiona el diagnóstico de falsos positivos con los consecuentes agravantes para la salud del presunto enfermo [Celeste et al., 2004].

Los resultados que se presentan parecen demostrar que: el diagnóstico realizado por la técnica de la ELISA con la fracción antigénica Fe-SODe es más fiable que mediante métodos serológicos convencionales como el IFI y, que las Fe-SOD excretadas por los 4 parásitos no presentan reacción cruzada entre ellas ni con otros Trypanosomatidos como el caso de *T. cruzi*, pudiendo de esta forma discriminar entre leishmaniasis y enfermedad de Chagas.

Mateo y colaboradores demostraron que la Fe-SODe purificada de *T. cruzi* presenta una sensibilidad mucho más alta que la misma no purificada [Mateo et al., 2010].

Por este motivo y por todo lo visto hasta el momento para poder confirmar la alta sensibilidad y especificidad de la Fe-SODE hemos decidido purificar las Fe-SOD excretada por estas 4 especies de *Leishmania*.

Tras purificar la Fe-SODE por medio de dos cromatografías, intercambio iónico y peso molecular, hemos encontrado que todas presentaban las mismas características físicas, pI alrededor de 3.75 y PM de 25kDa, de acuerdo con las características encontradas en *Phytomonas* spp. [Marin et al., 2006] y en *T. cruzi* [Mateo et al., 2010].

La Fe-SODE, obtenida dejando el cultivo de formas promastigotas en medio sin suero durante 24h, se ha pasado por cromatografía de intercambio iónico, realizándose cuatro replicas. Tras recolectar y liofilizar los picos de las 4 replicas se ha aplicado la muestra a una cromatografía de peso molecular, obteniendo de esta un único pico de proteínas y de actividad que correspondía a la Fe-SODE purificada, como se ha demostrado por gel de Nativa teñido con nitrato de plata.

En resumen: *L. (L.) infantum* ha sido purificada 112.88 veces con 875.97 U/mg de actividad específica, *L. (V.) braziliensis* 123.26 veces con 893.66 U/mg de actividad específica, *L. (L.) amazonensis* 101.62 veces y 615.65 U/mg y *L. (V.) peruviana* ha sido purificada 103.71 veces con una actividad de 630.61 U/mg.

Para demostrar la mayor sensibilidad y especificidad de la Fe-SODe de *L. (L.) infantum* purificada (Fe-SODe-Li) respecto a la misma no purificada (Fe-SODe-Li-np) hemos ensayado 145 sueros de perros procedentes de la Comunidad Autónoma Andalucía. Empleando como antígeno la Fe-SODe-Li-np el 23.44% de sueros dieron positivos por la técnica de ELISA y el 18.62% por la técnica de Western blot. Estos datos nos indican que la técnica de ELISA usando como antígeno la Fe-SODe-Li-np da el 4.8% de falsos positivos respecto al Western blot, datos coherentes con lo demostrado por otros autores, en el que el porcentaje de falsos positivos obtenidos en la técnica de ELISA era entre el 1.2 y el 9.6% [Arjona-Jiménez et al., 2012; López-Céspedes et al., 2012].

Al emplear como antígeno la Fe-SODe-Li, 61 sueros dieron positivos (42.07%) tanto a ELISA como a Western blot mostrando una correlación del 100%. Estos datos están de acuerdo con la prevalencia encontrada hasta el día de hoy en la región (entre el 37.2 y el 44.2%) [Chitimia et al., 2011; Acedo-Sanchez et al., 1996]

Con el fin de validar los resultados aquí obtenidos hemos ensayado, como controles positivos, 10 sueros de perros infectados por *L. (L.) infantum*, procedente de la Región Lombardía (Italia). Empleando la Fe-SODe-Li-np solo el 90% de los sueros dieron positivos mientras que obtuvimos el 100% de positividad empleando como antígeno la Fe-SODe-

Li; demostrando de, esta forma, la alta fiabilidad de los resultados obtenidos con la proteína purificada.

Como se había observado en *T. cruzi* [Mateo et al., 2010] nuestros resultados confirman la mayor sensibilidad de la Fe-SODe purificada respecto a la misma no purificada empleándose, además una cantidad 3 veces menor (1.5 µg/ pocillo Fe-SODe-Li-np y 0.5 µg/ pocillo Fe-SODe-Li).

Para poder demostrar la especificidad de la Fe-SODe purificada hemos decidido ensayar 51 sueros de pacientes enfermos de leishmaniasis, procedentes de Colombia frente a la Fe-SODe purificada de *L. (L.) amazonensis* (Fe-SODe-La) endémica en el país [WHO, 2010], y de *L. (V.) peruviana* (Fe-SODe-Lp) nunca descrita hasta el día de hoy en la región [WHO, 2010]. En este trabajo confirmamos otra vez que la sensibilidad de la Fe-SODe purificada es mucho más alta que la de la misma proteína no purificada. Además demostramos que no presenta reacción cruzada con otra especie de *Leishmania* en cuanto a que sólo el 11.76% de los sueros dieron positivos a la Fe-SODe-Lp y el 82,35% a la Fe-SODe-La. Aunque hasta el día de hoy no se hayan reportado casos de infecciones por *L. (V.) peruviana* en Colombia no significa que esta especie no exista en el país. Las fronteras con Perú y las continuas migraciones de humanos y otros animales a través de la selva amazónica

podrían ser una explicación de cómo *L. (V.) peruviana* ha sido introducida en Colombia.

Tras demostrar la alta sensibilidad y especificidad de la Fe-SODe purificada de *L. (L.) infantum*, *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis* y, por lo tanto, tener confianza en los resultados que se obtienen, hemos ensayados 213 sueros procedente de los estados de Hidalgo y Nuevo León (México) con la Fe-SODe-Lb con el objetivo de demostrar la posible infección en humano de *L. (V.) braziliensis*, hasta el día de hoy reportada sólo en perros de la región o de áreas limítrofes [Wright et al., 2008].

Al ensayar los sueros con la proteína purificada a una concentración de 0.5 µg/pocillo encontramos un 17.84% de positivos, usando una concentración final 10 veces menor (0.05 µg/pocillo) de la Fe-SODe purificada observamos los mismos resultados, demostrando por lo tanto que la Fe-SODe purificada es más sensible que la misma no purificada empleando hasta 13 veces menos cantidad. Además estamos poniendo de manifiesto la posible infección de humanos con *Leishmania (V.) braziliensis* en esta área.

La correspondencia del 100% entre las dos técnicas de ELISA y de Western blot fue confirmada una vez más ensayando estos sueros mexicanos, garantizándonos la fiabilidad de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA empleando como antígeno la proteína purificada.

Por lo visto hasta el momento, y pudiendo fiarnos de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA decidimos volver a ensayar los sueros de Perú utilizando las Fe-SODe purificada de las 4 especies de *Leishmania* con la técnica de ELISA empleando una concentración final de 0.05 µg/pocillo.

Como habíamos previsto, las prevalencias encontradas con las proteínas purificadas eran mucho más correctas que las encontradas en el primer trabajo. La prevalencia de *L. (L.) infantum* se ve drásticamente reducida, de acuerdo con la OMS que no considera esta especie endémica en el país [WHO, 2010]. Lo mismo se observa por los dos grupos de sueros separados según la manifestación clínica: ACL y SL. De los 68 sueros con ACL el 99% dieron positivos a *L. (V.) peruviana* (94% Fe-SODe-Lp-np), y el 38.23% a *L. (V.) braziliensis* (68% Fe-SODe-Lb-np). De los 45 sueros con SL el 97% dieron positivos a *L. (V.) braziliensis* (93% Fe-SODe-Lb-np) y sólo el 46.66% a *L. (V.) peruviana* (67% Fe-SODe-Lp-np). Los porcentajes de seroprevalencia más bajos encontrados son debidos a la eliminación de los falsos positivos generados por la técnica de ELISA cuando se emplea como antígeno la Fe-SODe no purificada debidos a posibles interferencias causadas por un antígeno no puro como ya se había observado ensayando los sueros procedentes de Colombia.

Hay que recordar que esta técnica de ELISA experimental detecta anticuerpos en suero, por lo que un paciente, con una manifestación

muco cutánea que procede de un área endémica para más de una especie de *Leishmania*, puede presentar anticuerpos frente a cada una de ellas sin padecer todas las infecciones en el momento de la toma de sangre y por lo tanto no presentar las manifestaciones clínicas específica por cada una de ellas.

También hemos vuelto a ensayar los 10 sueros de pacientes chagasicos crónicos procedentes de Chile frente a las 4 Fe-SODe purificadas y ningún suero dio positivo, confirmando la ausencia de reacción cruzada con *T. cruzi* también empleando la proteína purificada.

Por lo tanto los resultados obtenidos demuestran que la proteína purificada es altamente sensible (0.05 µg/pocillo) y sobre todo específica, no presentando reacción cruzada entre diferentes especies de *Leishmania* ni con otros Trypanosomatidos como *T. cruzi*.

Conclusiones

7. Conclusions

1. *Leishmania (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*, as the same observed for *L. (L.) infantum*, excrete an Iron-SOD (Fe-SODE) which presents immunological properties that converts it in a good molecular marker to use in serodiagnostic.
2. Fe-SOD excreted by *Leishmania (L.) infantum*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* present an isoelectrical point of about 3.75 and a molecular weight of about 25 kDa
3. Purified Fe-SODE presents a higher sensitivity and specificity than the same protein not purified, allowing us to eliminate the differences in sensitivity between the ELISA and Western blot techniques.

Summarizing, we have developed an ELISA able to detect specific antibodies for different *Leishmania* species. Furthermore, we have demonstrated that Fe-SOD excreted by *Leishmania* spp. is a good antigen that can be use in Leishmaniasis daily screening, thanks to its great sensitivity and its high specificity.

7. Conclusiones

1. *Leishmania* (V.) *peruviana*, *L.* (V.) *braziliensis* y *L.* (L.) *amazonensis*, al igual que *L.* (L.) *infantum*, excretan una Fe-SODe que presenta características inmunogenicas que la convierten en un buen marcador molecular para el serodiagnóstico.
2. La Fe-SOD excretada por *Leishmania* (L.) *infantum*, *L.* (V.) *peruviana*, *L.* (L.) *amazonensis* y *L.* (V.) *braziliensis* presenta un punto isoeléctrico alrededor de 3.75 y un peso molecular aproximado de 25kDa.
3. La Fe-SODe purificada presenta una sensibilidad y una especificidad mayor respecto a la misma proteína no purificada, permitiendo eliminar las diferencia de sensibilidad de las técnicas de ELISA y Western blot.

En resumen, hemos desarrollados un ELISA capaz de detectar anticuerpos específico por diferentes especies de *Leishmania*, demostrando que la Fe-SOD excretada por *Leishmania* spp. es un antígeno idóneo por su increíble sensibilidad y alta especificidad para serodiagnóstico rutinario de esta enfermedad.

Bibliografía

8. Bibliografía

Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*; 84:231–44 (1996).

Acedo Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas Márquez F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int J Parasitol*; 26(3):303-10 (1996).

Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus M. Diagnostic potential of western blot analysis of será from dogs with Leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg*; 58:154-159 (1998).

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*; 99:17–23 (2005).

Altamiro Enciso AJ. Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas del Antiguo Perú por la Leishmaniasis Tegumentaria

de forma mucosa. Tesis doctoral en Salud Pública de la Escola Nacional de Saúde Pública, *Fundação Oswaldo Cruz* (2000).

Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol*; 7: 603–615 (2011).

Arjona-Jiménez G, Villegas N, López-Céspedes A, Marín C, Longoni SS, Bolio-González ME, Rodríguez-Vivas RI, Sauri-Arceo CH, Sánchez-Moreno M. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 106(4):252-258 (2012).

Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Neto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RI, David JR, Reed SG. rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*; 173:758-761 (1996).

Balaban RS, Remoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*; 120(4):483-495 (2005).

Balaña-Fouce R, Calvo-Álvarez E, Alvarez-Velilla R, Prada CF, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol*; 181:85–93 (2012).

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*; 64:1-109 (2007).

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*; 3:205–214 (2004).

Barrouin-Melo SM, Larangeira, DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontesde-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 99: 195-7 (2004).

Beyer WF and Fridovich I. Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions. *Anal Biochem*; 161:559-566 (1987).

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeik YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: Two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*; 102(2):249-61 (1999).

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*; 12:64–76 (2000).

Borja-Cabrera GP, da Silva VO, da Costa RT, Barbosa Reis A, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-de-Sousa CB. The FML-ELISA assay in diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*; 61:296–301 (1999).

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* ; 72:248-54 (1976).

Braz RF, Nascimento ET, Martins DR, Wilson ME, Pearson RD, Reed SG, Jeronimo SM. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American Visceral

Leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am Soc Trop Med Hyg*; 67(4):344-348 (2002).

Brydges SD, Carruthers VB. Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*; 15;116(Pt 22):4675-85 (2003).

Brouwer M, Hoexum Brouwer T, Grater W, Brown-Peterson N. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem J*; 15;374(Pt 1):219-28 (2003).

Burnette WN. "Western blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal Biochem*; 112 (2):195-203 (1981).

Burns JM, Sheffler WG, Benson DR, Gihalb HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral Leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:775-779 (1993).

Cabezón O, Millán J, Gomis M, Dubey JP, Ferroglio E, Almería S. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol Res*; 107(6):1505-8 (2010).

Cáceres, OR, Montoya YP. Diseño y evaluación de tres oligonucleótidos para la detección de *Leishmania* por PCR. *Rev Peru Med Exp, Salud Publica*; 19(3):109-116 (2002).

Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev Inst Med Trop*; 8: 227–234 (1966).

Catania S. *Leishmania viscerale* in età pediatrica. *Simposio: Controllo della Leishmaniosi: Veterinari e Medici a confronto*, Roma, pp. 8–9, (2003).

Carrera L, Fermin ML, Tesouro M, Garcia P, Rollan E, Gonzalez JL, Mendez S, Cuquerella M, Alunda JM. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol*; 82:139-146 (1996).

Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 43(4):289-95 (2002).

Cassel RH, Fridovich I. Role of a superoxide radical in the autoxidation of cytochrome C. *Biochem*; 14:1866-1869 (1975).

Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*; 37(11):1591-3 (2004).

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Ann Rev Microbiol*; 44: 499-529 (1990).

Chang, KP, Dwyer DM. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: Cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *J Exp Med*; 147(2):515-30 (1978).

Chitimia L, Muñoz-García CI, Sánchez-Velasco D, Lizana V, Del Río L, Murcia L, Fisa R, Riera C, Giménez-Font P, Jiménez-Montalbán P, Martínez-Ramírez A, Meseguer-Meseguer JM, García-Bacete I, Sánchez-Isarria MA,

Sanchis-Monsonís G, García-Martínez JD, Vicente V, Segovia M, Berriatua E. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet Parasitol*; 181(1):12-6 (2011).

Cordova-Uscanga C, Albertos-Alpuche NE, Andrade-Narvaez FJ, Canto-Lara SB. Leishmaniasis: a preliminary epidemiological study in a locality of the endemic area in the state of the Tabasco. *Salud Publica Mex*; 35(4):345–50 (1993).

Crowther S, Fulton JD, Joyner LP. The metabolism of *Leishmania donovani* in culture. *Biochem J*; 56(2):182-5 (1954).

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*; 123(3):357-88 (2006).

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mo Pathol*; 72(2):132-41 (2002).

Current Protocols, Section II (1995)

da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, Paraguai de Souza E, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. A phase III trial of efficacy of the

FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*; 19:1068–1081 (2001).

Davies CR. Effetto di una banda protettiva a base di deltametrina sull' incidenza di leishmaniosi viscerale zoonotica nei bambini. *Simposio: Controllo della Leishmaniosi: Veterinari e Medici a confronto, Roma.* pp. 13–14 (2003).

de Souza Dias S, da Costa Pinheiro PH, Katz S, dos Santos MR, Barbiéri CL. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*; 72(2):126-132 (2005).

Dive D, Gratepanche S, Yera H, Bécuwe P, Daher W, Delplace P, Odberg-Ferragut C, Capron M, Khalife J. Superoxide dismutase in Plasmodium: a current survey . *Redox Rep* 8(5):265-7 (2003).

Docampo R. Antioxidant Mechanisms. *Biochemistry and Molecular Biology of Parasitology* (Ed. Marr, J. J. y Müller, M.), *Academic Press* (San Diego); 147- 160 (1995).

Dufernez F, Yernaux C, Gerbod D, Noël C, Chauvenet M, Wintjens R, Edgcomb V, Capron M, Opperdoes FR, Viscogliosi E. The Presence of Four Iron-

Containing Superoxide Dismutase Isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, Subcellular Localization and Phylogenetic Origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med*; 40 (2): 210-225 (2006).

Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang T-T. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*; 24: 367–380 (2005).

EI-Hassan AM, Zijlstra EE. Leishmaniasis in Sudan. Mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 95 Suppl 1:S19-26 (2001).

Evans P, Halliwell B. Micronutrients: Oxidant/Antioxidant Status. *Br J Nutr*; 85(2):67 (2001).

Fernandez-Perez FJ, Gomez-Muñoz MT, Mendez S, Alunda JM. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop*; 86:83-91 (2003).

Ferreira WA, Mayrink W, dos Mares-Guia ML, Tavares CA. Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous

leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 45(1):35-43 (2003).

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*; 64:97-112 (1995).

Fridovich I. Superoxide Dismutases: An Adaptation to a Paramagnetic Gas. *J Biol Chem*; 264: 7761-7764 (1989).

Fujii M, Ishii N, Joguchi A, Yasuda K, Ayusawa D. A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res*; 28;5(1):25-30 (1998).

Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*; 55(2):239-49 (2002).

Garcia-Ruiz Rubio MA. Superóxido dismutasa en *Ascaris suum* (Goeze, 1782). Aislamiento, purificación e inhibición por antihelmínticos benzimidazoles y derivados de nueva síntesis. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada pp 288 (1987).

Genetu A, Gadisa E, Aseffa A, Barr S, Lakew M, Jirata D, Kuru T, Kidane D, Hunegnaw M, Gedamu L.. *Leishmania aethiopica*: strain identification and characterization of superoxide dismutase-B genes. *Exp parasitol*; 113:221–226 (2006).

Gibson ME. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist*; 27:203-13 (1983).

Gilbert DL. Fifty Years of Radical Ideas. *Ann N Y Acad Sci*; 899:1-14 (2000).

Gilroy C, Olenyik T, Roberts SC, Ullman B. Spermidine synthase is required for virulence of *Leishmania donovani*. *Infect Immun*; 79(7):2764-9 (2011).

Gradoni L, Iorio M, Gramiccia M, Orsini S. In vivo effect of eflornithine (DFMO) and some related compounds on *Leishmania infantum* preliminary communication. *Farmaco*; 44(12):1157-66 (1989).

Graffmo KS, Forsberg K, Bergh J, Birve A, Zetterström P, Andersen PM, Marklund SL, Brännström T. Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*; 22(1):51-60 (2013).

Guillén Llera JL, Lopez Garcia ML, Martin Reinoso E, De Vivar Gonzalez R. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine Leishmaniasis and Ehrlichiosis. *Vet Parasitol*; 109:185-190 (2002).

Harms G, Scherbaum H, Reiter-Owona I, Stich A, Richter J. Treatment of imported New World cutaneous leishmaniasis in Germany. *Int J Dermatol*; 50(11):1336-42 (2011).

Hernández-Chinea C. *Leishmania amazonensis*: humoral response to amastigote excreted-antigens in murine leishmaniasis. *Exp Parasitol*; 116(4):492-6 (2007).

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*; 354(9185):1191-9 (1999).

Hunziker T, Berger C, Staubli G, Tschopp A, Weber R, Nadal D, Hatz C, Schlagenhauf P. Profile of travel-associated illness in children, Zürich, Switzerland. *J Travel Med*; 19(3):158-62 (2012).

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of Leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol*; 113:99-113 (2003).

James ER, McLean DC Jr, Perler F. Molecular cloning of an *Onchocerca volvulus* extracellular Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect Immun*; 62(2):713-6 (1994).

Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*; 21:145–148 (1995).

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: Friends or foes. *Trends Parasitol*; 22(9):439-45 (2006).

Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res*; 123:423–438 (2006).

Keithly JS, Fairlamb AH. Inhibition of *Leishmania* species by alpha-difluoromethylornithine. In: Hart, DT., editor. *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. New York: Plenum Press; p. 749-756 (1987).

Kim JY, Na BK, Song KJ, Park MH, Park YK, Kim TS. Functional expression and characterization of an iron-containing superoxide dismutase of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res*; 111(4):1673-82 (2012).

Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Böhm M, O'Rourke B, Maack C. Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation*; 121(14):1606-13 (2010).

Lakhal S, Mekki S, Ben-Abda I, Mousli M, Amri F, Aoun K, Bouratbine A. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude leishmania histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*; 19(9):1487-91 (2012).

Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Ann Parasitol Hum Comp*; 63(2):134-45 (1988).

Laison R, Saw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., and Killick- Kendrick, R. (eds.), *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Academic Press, New York (1987).

Lasri S, Sahibi H, Natami A, Rhalem A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*; 91:13-18 (2003).

Le Trant N, Meshnick SR, Kitchener K, Eaton JW, Cerami A . Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. *J Biol Chem*; 10;258(1):125-30 (1983).

Lofgren R. The structure of *Leishmania tropica* as revealed by phase and electron microscopy. *J. Bacteriol*; 60(5):617 (1950).

López-Céspedes A, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, Sánchez-Moreno M, Rodríguez-Vivas RI, Escobedo-Ortegón FJ, Barrera-Pérez MA, Bolio-González ME, Marín C. *Leishmania* spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *ScientificWorldJournal*; doi: 10.1100/2012/945871 (2012).

Magill AJ. Leishmaniasis. In: Strickland, G.T. (ed.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging and Infectious Diseases*. Saunders WB Company, Philadelphia, USA. (2000).

Marín C, Longoni SS, Mateo H, de Diego JA, Alunda JM, Minaya G, Sánchez-Moreno M. *Leishmania infantum*: Use of excreted superoxide dismutase in ELISA and Western blotting for serologic diagnostic in naturally infected dogs. *Parasitol Res*; 101:801–808 (2007).

Marín C, Rodríguez-González I, Sánchez-Moreno M. Identification of secreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101(6):649-654 (2006).

Marín C, Hitos AB, Rodríguez-González I, Dollet M, Sánchez-Moreno M. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol Lett*; 234(1):69-74 (2004).

Maspero G. The dawn of civilization. Egypt and Chaldaea. London: *Society for the Promotion of Christian Knowledge* (1910).

Mateo H, Sánchez-Moreno M, Marín C. Enzyme-linked immunosorbent assay with purified *Trypanosoma cruzi* excreted superoxide dismutase. *Clin Biochem*; 43(15):1257-64 (2010).

Mateo H, Marín C, Pérez-Cordón G, Sánchez-Moreno M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 103(3):271-6 (2008).

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the sutoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*; 47:469-474 (1974).

McCord JM and Fridovich I. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*; 244:6049-55 (1969).

McLellan SL. Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolated from Urban Rivers and Beach Water. *Appl Environ Microbiol*; 70 (82004): 4658-4665 (2004)

Meshnick S, Eaton JW. Leishmanial Superoxide dismutase a possible target for chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*; 102:970-976 (1981).

Millán J, Zanet S, Gomis M, Trisciuglio A, Negre N, Ferroglio E. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg Dis*; 158(4):352-7 (2010).

Ministerio de Salud Peruano, Leishmaniasis, Modulos Tecnicos Serie Documentos monograficos N° 8, Lima (2000).

Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors*; 27;5:60 (2012).

Misra HP, Fridovich I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J Biol Chem*; 247:188-193 (1972).

Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*; 190:268-271 (2012).

Montoya Y, Padilla C, Nolasco O, Leon C, Talledo M. Diagnóstico molecular para la leishmaniasis. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*; 14(1):25-28 (1997).

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*; 145:245-252 (2007).

Mukhopadhyay R, Madhubala R. Effect of a bis(benzyl)polyamine analogue, and DL-alpha-difluoromethylornithine on parasite suppression and cellular polyamine levels in golden hamster during *Leishmania donovani* infection. *Pharmacol Res*; 28(4):359-65 (1993).

Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R, Huang TT, Epstein CJ, Roberts LJ II, Csete M, Faulkner JA and Van Remmen H. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med*; 40:1993–2004 (2006).

Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett*; 33:35–40 (1992).

Murakami K, Shimizu T, Irie K. Formation of the 42-mer Amyloid β Radical and the Therapeutic Role of Superoxide Dismutase in Alzheimer's Disease. *J Amino Acids*; doi: 10.4061/2011/654207 (2011).

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*; 366(9496):1561-77 (2005).

Murray HW, Szuro-Sudol A, Wellner D, Oca MJ, Granger a M, Libby DM, Rothermel CD, Rubin BY. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun*; 57: 845–849 (1989).

Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*; 5(1):67 (2012).

Nicolle C, Compté C. Culture du parasite du bouton d'orient. *CR Hebd Séances Acad sci*; 146:842-53 (1908).

Noda Y, Ota K, Shirasawa T and Shimizu T. Copper/zinc superoxide dismutase insufficiency impairs progesterone secretion and fertility in female mice. *Biol Reprod*; 86: 1–8 (2012).

Nojiri H Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Tsuda C, Miyazaki T, Saito M, Marumo K, Yonezawa I, Kaneko K, Shirasawa T, Shimizu T. Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking. *J Bone Miner Res*; 26: 2682–2694 (2011).

OGE (Oficina General de Epidemiología) e **INS** (Instituto Nacional de Salud). Leishmaniasis. Módulos Técnico. Serie Documentos Monográficos n° 8. Lima. (2000).

Olenyik T, Gilroy C, Ullman B. Oral putrescine restores virulence of ornithine decarboxylase-deficient *Leishmania donovani* in mice. *Mol Biochem Parasitol*; 176(2):109–111 (2011).

Oliveira-Freitas E, Casas CP, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Nico D, Souza LOP, Tinoco LW, da Silva BP, Palatnik M, Parente JP, Palatnik de Sousa CB. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*; 24:3909–3920 (2006).

Olivia G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Butaud T, Guegand L, Martin V, Cusinier AM, Gueguen S, Cañavate C and Gradoni L. Evidence for protection against active infection and disease progression in naïve dogs vaccinated with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) exposed to two consecutive *Leishmania infantum* transmission seasons. XXVII Congresso Italiano di Parassitologia (Alghero, 26-29 giugno 2012). *Mappe Parassitologiche* 18:34.

Oumeish OY. Cutaneous Leishmaniasis: A historical perspective. *Clin. Dermatol* 17(3):249-54 (1999).

Palatnik CB, Borojevic R, Previato JO, Mendonça-Previato L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate. *Infect Immun*; 57:754–763 (1989).

Palatnik-de-Sousa CB Vaccines for canine leishmaniasis. *Front Immunol*; 3: 69 (2012).

Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, Rodrigues MM, Soares I, Borja-Cabrera GP. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines*; 7(6):833-51 (2008).

Palatnik-de-Sousa CB, Gomes EM, Paraguai de Souza E, Luz K, Palatnik M, Borojevic R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the Fucose Mannose Ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 89:390–393 (1995).

Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol*; 90: 203–221 (1997).

Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra G, Soto M, Alonso C, Carvalho EM. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*; 12(10):1164-7 (2005).

Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J*; 403(2), 323-334 (2007).

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*; 32:746-749 (1994).

Poeppl W, Herkner H, Tobudic S, Faas A, Auer H, Mooseder G, Burgmann H, Walochnik J. Seroprevalence and asymptomatic carriage of *Leishmania* spp. in Austria, a non-endemic European country. *Clin Microbiol Infect*; doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03960.x. (2012).

Poeppl W, Walochnik J, Pustelnik T, Auer H, Mooseder G. Cutaneous leishmaniasis after travel to Cyprus and successful treatment with miltefosine. *Am J Trop Med Hig*; 84(4):562-5 (2011).

Porrozzì R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*; 14(5):544-8 (2007).

Praticò D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci*; 1147:70-8 (2008).

Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. Análisis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp 70: design of sy thetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immun Letter*; 63: 169–174 (1998).

Ramírez JL, Guevara P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 92: 333–338 (1997).

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *K Clin Microbiol*; 37:2931-5 (1999).

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol*; 45(1):21-25 (2007).

Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*; 40(3):1037-43 (2002).

Romero LI, Paz HM, Ortega-Barría E, Bayard V, Hochberg LP, Collins KM, Chan AS, Ryan JR. Evaluation of serological assays based on a novel excreted antigen preparation for the diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *J Microbiol Methods*; 57(3):391-7 (2004).

Rosbotham, JL, Corbett EL, Grant HR, Hay RJ, Bryceson AD. Imported mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*; 21(4):288-90 (1996).

Rüfenacht S, Sager H, Müller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, Roosje PJ. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Vet Rec*; 156(17):542-5 (2005).

Russo BC, Horzempa J, O'Dee DM, Schmitt DM, Brown MJ, Carlson PE Jr, Xavier RJ, Nau GJ. A *Francisella tularensis* locus required for spermine responsiveness is necessary for virulence. *Infect Immun*; 79(9):3665-76 (2011).

Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigotes antigen detects immuno- globulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*; 40: 1037–1043 (2002).

Sánchez-Saldaña, L, Sáez-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, Regis-Roggero A. Leishmaniasis. *Dermatol Peruana*; 14:82-98 (2004).

Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fausser I, Rebollar-Téllez EA. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 104(6):406-11 (2010).

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the

diagnosis of canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*; 73:82-86 (2005)

Schott EJ, Pecher WT, Okafor F, Vasta GR. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. *Exp Parasitol*; 105(3-4):232-40 (2003).

Serarslan G, Yilmaz HR, Söğüt S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*; 30(3), 267-271 (2005).

Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*; 45(4):255-72 (2008).

Shaw SE, Hillman T, Wray J. Unusual case of canine leishmaniasis in the UK. *Vet Rec*; 30;163(9):283 (2008).

Sienkiewicz N, Daher W, Dive D, Wrenger C, Viscogliosi E, Wintjens R, Jouin H, Capron M, Müller S, Khalife J. Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*; 137(1):121-32 (2004).

Sies, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress* (Ed. Sies, H.), Academic Press (Orlando): 1- 8 (1985)

Sing R, Silvakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*; 49(1):55-60 (2003)

Silva da ES, Van der Meide WF, Schoone GJ, Montijo CMF, Challig HDFH, Brazil RP,. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun*; 30: 637–643 (2006).

Sayre LM, Perry G, Smith M a Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*; 21: 172–188 (2008).

Suliman HB, Ryan LK, Bishop L, Folz RJ. Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 280(1):L69-78 (2001).

Tannich I, Bruchhaus RDI, Walter RD, Horstmann RD. Pathogenic and Non-Pathogenic *Entamoeba histolytica*: Identification and Molecular Cloning of an Iron-Containing Superoxide Dismutase. *Mol Biochem Parasitolol*; 49:61-72 (1991).

Tang L, Ou X, Henkle-Dührsen K, Selkirk ME. Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from *Brugia lymphatic filarial* nematode parasites. *Infect Immun*; 62(3):961-7 (1994).

Taoufiq Z, Pino P, Dugas N, Conti M, Tefit M, Mazier D and Vouldoukis I. Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against *Plasmodium falciparum*-induced oxidative stress. *Mol Biochem Parasitol*; 150(2):166-73 (2006).

Tavares CAP, Fernandez AP and Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn*; 3(5):657-667 (2003).

Tebourski F, el Gaied A, Louzir H, Ben Ismail R, Kammoun R and Dellagi K. Identification of an immunodominant 32-kilodalton membrane protein of *Leishmania donovani infantum* promastigotes suitable for specific diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*; 32(10):2474-80 (1994).

Trager, W. The development of *Leishmania donovani in vitro* at 37°C, effects of the kind of serum. *J Exp Med*; 97:177-188 (1953).

Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*; 51(2):337-351 (2011).

Vargas JJ. Inmunodiagnostico de la leishmaniasis visceral zoonotica en caninos infectados con *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia *Tesis de Maestria en Microbiologia* 97pp (2005).

Velasco-Castrejon O, Soriano-Rosas J and Rivera-Reyes HH. Severe myocardial damage caused by leptospirosis. Report of a fatal case in Mexico. *Arch Cardiol Mex*; 79(4):268-273 (2009).

Viscogliosi E, Delgado-Viscogliosi P, Gerbod D, Dauchez M, Gratepanche S, Alix AJP, Dive D. Cloning and Expression of an Iron-Containing Superoxide Dismutase in the Parasitic Protist *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett*; 161:115- 123 (1998).

Villagrán ME, Marín C, Rodríguez-Gonzalez I, De Diego JA, Sánchez-Moreno M. Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma cruzi* in the diagnosis of Chagas disease: seroprevalence in rural zones of the state of Queretaro, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*; 73(3):510-6 (2005).

Wall EC, Watson J, Armstrong M, Chiodini PL and Lockwood DN. Epidemiology of imported cutaneous leishmaniasis at the Hospital for

Tropical Diseases, London, United Kingdom: use of polymerase chain reaction to identify the species. *Am J Trop Med Hyg*; 86(1):115-8 (2012).

Wang JL, Wang PC. The effect of aging on the DNA damage and repair capacity in 2BS cells undergoing oxidative stress. *Mol Biol Rep*; 39(1):233-41 (2012).

Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(8):4556-60 (1998).

WHO. Control of the leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series, Geneva (2010).

WHO. http://www.who.int/Leishmaniasis/Leishmaniasis_maps/en/index.html. Accessed September (2009).

WHO. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. (2007).

Wilson ME, Andersen KA, Britigan BE. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect Immun*; 62: 5133–5141 (1994).

Wintjens R, Noël C, May AC, Gerbod D, Dufernez F, Capron M, Viscogliosi E and Rooman M. Specificity and phenetic relationships of iron- and manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons. *J Biol Chem*; 279(10):9248-54 (2004).

Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Ahmed A, Horn D, Kelly JM. Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med*; 15;40(2):198-209 (2006).

Wright NA, Davis LE, Aftergut KS, Parrish CA, Cockerell CJ. Cutaneous leishmaniasis in Texas: A northern spread of endemic areas. *J Am Acad Dermatol*; 58: 650–652 (2008).

Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO. A Novel Nickel-Containing Superoxide Dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J*; 318: 889- 896 (1996).66

Agradecimientos

9. Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a los directores de Tesis, la Dr. Clotilde Marín Sánchez y el Dr. Manuel Sánchez Moreno, de particular manera este ultimo por haberme acercado al mundo de los Trypanosomatidos cuando yo pensaba nada más que en malaria, por su trato ameno y también por sus refunfuñeos ... se echarán de menos.

I would like to thank you Dr. Graham H. Coombs from Strathclyde University for giving to me the opportunity to work in his lab and to learn new useful techniques.

A very special thanks to Dr. Roderick Williams from Strathclyde University and University of West Scotland, who taught me in 7 months more than anyone else did before. I will never forget his answer after asking him some explanation: "There are a lot of papers in PubMed!"

Un ringraziamento particolare alla mia famiglia e ai miei amici per avermi appoggiato durante questo periodo duro, complicato ma anche felice e stravagante.

Quisiera agradecer también a mis compañeros de laboratorio por haber hecho los días entretenidos, el aburrimiento nunca ha sido la orden del día.

To all my “Scottish” friends, thanks to this theses I met you, I really enjoy every single moment spent with all of you.

Y por último, no porque sean de menor importancia, el más sincero agradecimiento a mis protozoos, olvidados por muchos pero muy queridos por mí.

