



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**BIO-REACTIVOS CON POTENCIAL DE  
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS  
CÚTANEA CONTRA ANTÍGENOS DEL  
ESTADIO AMASTIGOTE DEFINIDOS  
MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE PHAGE  
DISPLAY**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**ALLISON MELANIE ARONI SOTO**

**LIMA – PERÚ**

**2017**



**Miembros del jurado que aprobaron la presente tesis**

Presidente

Dionicia Gamboa Vilela, PhD

Vocal

Holger Mayta Malpartida, PhD

Secretario

Teresa Barreto Gaviria, MSc

**ASESOR**

Jorge Arévalo Zelada, PhD

## **DEDICATORIA**

A mi familia, mis padres Paty y Arturo, mis hermanos Warren, Anthony y Rosa, cuyo esfuerzo y soporte permitieron la realización de mis metas.

A Luigi, por su tiempo, comprensión y ayuda constante.

## AGRADECIMIENTOS

Al PhD Jorge Arévalo, por la asesoría del presente trabajo de tesis, el apoyo y empuje en todo momento. Por sus enseñanzas y sugerencias tanto en el ámbito profesional como el personal.

A los miembros del jurado: PhD Dionicia Gamboa Vilela, PhD Holger Mayta Malpartida y MSc Teresa Barreto Gaviria, por sus sugerencias y contribuciones.

A Peter Kristensen, Potjamas Pansri, Karen Marie Juuls Sorensen y todos los miembros del Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus – Dinamarca, por sus instrucciones, enseñanzas y comprensión en el entrenamiento de la tecnología *Phage Display* así como la donación de la biblioteca sintética PREDATOR.

Al grupo de investigación Patho-Antígenos en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Por las facilidades brindadas en el uso de equipos de laboratorio y a Marlene por su asesoramiento y guía en el desarrollo del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONCYTEC) – Universidad Peruana Cayetano Heredia, por la beca otorgada para seguir los estudios de post-grado y la realización de la tesis.

A mis compañeros Karina, Juan José, Fabiola y Javier por su apoyo constante y en la revisión del manuscrito.

## TABLA DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| <b>I. Introducción</b> .....   | 1  |
| <b>II. Planteamiento del problema</b> .....  | 3  |
| <b>III. Marco teórico</b> .....  | 6  |
| 3.1 Leishmaniasis y sus manifestaciones clínicas .....                                   | 6  |
| 3.1.1 Leishmaniasis Visceral (LV) .....  | 6  |
| 3.1.2 Leishmaniasis Cutánea (LC): .....  | 7  |
| 3.1.3 Leishmaniasis Mucosa (LM):.....  | 8  |
| 3.1.4 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC): .....   | 8  |
| 3.2 Distribución Geográfica y epidemiología de la leishmaniasis.....                     | 10 |
| 3.3 El parásito de <i>Leishmania</i> .....   | 14 |
| 3.3.1 Características generales y ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....               | 14 |
| 3.3.2 Aspectos Morfológicos de los estadios de <i>Leishmania</i> .....                   | 15 |
| 3.3.3 Aspectos Bioquímicos y antígenos de superficie .....                               | 16 |
| 3.4 Diagnóstico de LC y problemática en los centros de atención primaria (CAP).<br>..... | 18 |
| 3.4.1 Métodos de diagnóstico convencional directo.....                                   | 18 |
| 3.4.2 Métodos de diagnóstico convencional indirecto .....                                | 20 |
| 3.4.3 Métodos de diagnóstico modernos.....   | 21 |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 3.5         | Antígenos utilizados en métodos de diagnóstico de LC .....                  | 22        |
| 3.6         | Tecnología de anticuerpos.....  | 23        |
| 3.6.1       | Estructura del anticuerpo .....   | 23        |
| 3.6.2       | Relación antígeno – anticuerpo .....  | 26        |
| 3.6.3       | Anticuerpos monoclonales y recombinantes .....                              | 26        |
| 3.6.4       | Anticuerpos de dominio único.....   | 31        |
| 3.6.5       | Bibliotecas de anticuerpos .....  | 34        |
| 3.7         | Tecnología de <i>Phage Display</i> y bibliotecas de fagos-anticuerpos ..... | 35        |
| 3.7.1       | Fagémidos.....  | 41        |
| 3.7.2       | Bio-cribado o selección en la tecnología de fago-anticuerpo .....           | 43        |
| 3.8         | Biblioteca sintética de sdAb denominada PREDATOR .....                      | 45        |
| 3.9         | Aplicaciones en el diagnóstico de la tecnología <i>Phage Display</i> .....  | 48        |
| <b>IV.</b>  | <b>Justificación .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>V.</b>   | <b>Hipótesis.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>VI.</b>  | <b>Objetivos.....</b>   | <b>50</b> |
|             | Objetivo general.....   | 50        |
|             | Objetivos específicos.....  | 50        |
| <b>VII.</b> | <b>Metodología .....</b>  | <b>51</b> |
| 7.1         | Muestras biológicas .....   | 51        |



|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| 7.1.1        | Cepas de <i>Leishmania</i> .....  | 51        |
| 7.1.2        | Cepa de <i>Trypanozoma cruzi</i> y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) .....                    | 51        |
| 7.1.3        | Modelo murino .....   | 51        |
| 7.1.4        | Biblioteca PREDATOR .....   | 52        |
| 7.2          | Reactivos y materiales .....  | 52        |
| 7.3          | Diseño del estudio.....   | 54        |
| 7.4          | Flujograma del estudio .....  | 55        |
| 7.5          | Procedimiento.....  | 56        |
| 7.5.1        | Obtención de parásitos .....  | 56        |
| 7.5.2        | Selección de fagos-sdAbs candidatos .....   | 61        |
| 7.5.3        | Producción de los sdAbs a partir de los candidatos definidos y su evaluación contra amastigotes axénicos..... | 70        |
| 7.5.4        | Evaluación de la respuesta de los sdAbs contra amastigotes extraídos de oreja de ratón.....                   | 81        |
| 7.5.5        | Análisis estadístico .....  | 81        |
| <b>VIII.</b> | <b>Resultados.....</b>  | <b>82</b> |
| 8.1          | Obtención de parásitos de <i>Leishmania</i> .....   | 82        |
| 8.1.1        | Método “ <i>in vitro</i> ” .....  | 82        |

|              |   |            |
|--------------|---|------------|
| 8.1.2        | Método “ <i>in vivo</i> ” .....   | 85         |
| 8.2          | Selección de los fagos-sdAbs candidatos por bio-cribado y ensayo de fago-ELISA .....                    | 93         |
| 8.2.1        | Bio-cribado por método de fijación en placa .....   | 93         |
| 8.2.2        | Bio-cribado por método en suspensión .....  | 98         |
| 8.3          | Clonamiento, expresión, caracterización y evaluación de capacidad de unión específica de los sdAbs..... | 109        |
| 8.3.1        | Candidatos seleccionados por método de bio-cribado A y B .....  | 109        |
| 8.3.2        | Candidatos seleccionados por método de bio-cribado C.....   | 118        |
| 8.4          | Análisis contra amastigotes extraídos de oreja de ratón infectados .....                                | 132        |
| 8.4.1        | Análisis de los candidatos resultantes del método de bio-cribado A y B .....                            | 132        |
| 8.4.2        | Análisis de los candidatos resultantes del método de bio-cribado C ..                                   | 132        |
| <b>IX.</b>   | <b>Discusión</b> .....  | <b>136</b> |
| <b>X.</b>    | <b>Conclusiones</b> .....   | <b>143</b> |
| <b>XI.</b>   | <b>Recomendaciones</b> .....  | <b>144</b> |
| <b>XII.</b>  | <b>Referencias Bibliográficas</b> .....   | <b>145</b> |
| <b>XIII.</b> | <b>Anexos</b> .....   | <b>171</b> |

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 01.** Distribución de las especies de *Leishmania* en el Perú de acuerdo a las regiones naturales y departamentos.

**Tabla 02.** Comparación de características generales entre las tecnologías de generación de anticuerpos.

**Tabla 03.** Comparación de las tecnologías Display: tecnología *Phage Display*, tecnología *Ribosoma Display*, tecnología *Yeast Display* y tecnología de células B para la selección de péptidos/proteínas y anticuerpos.

**Tabla 04.** Componentes de la reacción de digestión del ADN del fagémido con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI*.

**Tabla 05.** Componentes de la reacción de ligación del fragmento de ADN del sdAb con el vector pET22b(+).

**Tabla 06.** Componentes de la reacción de PCR de ADN de colonia usando la enzima ADN polimerasa HotStarTaq.

**Tabla 07.** Análisis estadístico T-student de la comparación del grosor de la oreja izquierda infectada con *L. (L.) amazonensis* LV79 contra la oreja derecha no infectada en ratón BALB/c.

**Tabla 08.** Análisis de varianza para un factor del candidato fago-sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares.

**Tabla 09.** Análisis estadístico de T-student del fago-sdAb 6BIC contra amastigotes extraídos de oreja infectada contra lisado de oreja sana.

**Tabla 10.** Producción del sdAb como proteína soluble expresado a partir de células *E. coli* BL21g transformadas con pET22b(+) ligado al sdAb y cuantificado por espectrofotometría a 280 nm en Nanodrop.

**Tabla 11.** Producción del sdAb 6BIC y 3CIC como proteína soluble expresado a partir de células *E. coli* BL21g transformadas con pET22b(+) ligado al sdAb y cuantificado por espectrofotometría a 280 nm en Nanodrop.

**Tabla 12.** Análisis de varianza para un factor del candidato sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares.

**Tabla 13.** Análisis estadístico de T-student del sdAb 6BIC contra amastigotes extraídos de oreja infectada y lisado de oreja de ratón sano.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Manifestación clínica de leishmaniasis visceral.
- Figura 02.** Manifestación clínica de la leishmaniasis cutánea.
- Figura 03.** Manifestación clínica de la leishmaniasis mucocutánea con una lesión destructiva en la nariz.
- Figura 04.** Distribución a nivel mundial de la leishmaniasis.
- Figura 05.** Representación esquemática de la superficie celular de *Leishmania*.
- Figura 06.** Estructura de un anticuerpo.
- Figura 07.** Representación esquemática de tipos de anticuerpos recombinantes.
- Figura 08.** Tipos de anticuerpos de cadena pesada a partir del suero de camélidos.
- Figura 09.** Representación esquemática de un anticuerpo de dominio único VHH.
- Figura 10.** Formatos de tecnología Display en la expresión de anticuerpos recombinantes.
- Figura 11.** Representación esquemática del fago vector de la tecnología *Phage Display*.
- Figura 12.** Diagrama esquemático de los componentes de un fagémido.
- Figura 13.** Proceso de Bio-cribado en la tecnología *Phage Display*.
- Figura 14.** Mapa del vector de la biblioteca PREDATOR.
- Figura 15.** Esquemas de selección en el proceso de Bio-cribado.
- Figura 16.** Protocolo de ciclado de PCR de ADN de colonia con la ADN polimerasa HotStarTaq.
- Figura 17.** Diferenciación de promastigotes-amastigotes axénicos.
- Figura 18.** Viabilidad de los amastigotes axénicos por microscopia de luz.

**Figura 19.** Promedio del grosor de las orejas de ratones BALB/c machos en la 7<sup>ma</sup> semana post-infección en la oreja izquierda con 4 especies de *Leishmania*.

**Figura 20.** Infección en ambas orejas de ratón BALB/c con *L. (L.) amazonensis* LV79.

**Figura 21.** Observación por microscopia del lisado de oreja infectada con *L. (L.) amazonensis* LV79 de ratón BALB/c.

**Figura 22.** Cantidad total de amastigotes extraídos a partir de ambas orejas de ratón BALB/c infectado con *L. (L.) amazonensis* LV79.

**Figura 23.** Selección de fagos-sdAbs candidatos mediante fago-ELISA a partir de clones obtenidos del método de bio-cribado A.

**Figura 24.** Estandarización del tampón de bloqueo más adecuado para los ensayos de ELISA-fago-sdAb.

**Figura 25.** Respuesta de la dilución seriada de los candidatos fagos-sdAbs seleccionados en el proceso de bio-cribado A.

**Figura 26.** Selección de los candidatos fagos-sdAbs mediante fago-ELISA a partir de clones obtenidos del método de bio-cribado C.

**Figura 27.** Respuesta de la dilución seriada de los candidatos fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes axénicos.

**Figura 28.** Evaluación de la respuesta de los fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares.

**Figura 29.** Análisis de los fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra el estadio amastigote y promastigote de *Leishmania*.

**Figura 30.** Análisis de los fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes extraídos de ratón.

**Figura 31.** Digestión del ADN del fagémido de los candidatos con enzimas de restricción *NcoI* y *NotI*.

**Figura 32.** Análisis de recombinantes en pET22b(+)-sdAb por PCR.

**Figura 33.** Alineamiento de las secuencias de los aminoácidos de los candidatos sdAbs 4DAI, 11DAIV, 2CAI y 2EAV contra la secuencia de aminoácidos del sdAb HEL4, que fue base de la biblioteca PREDATOR, con el programa CLC Sequence viewer versión 7.

**Figura 34.** Verificación de la pureza de los sdAbs después del proceso de expresión y purificación mediante electroforesis en poliacrilamida al 15%.

**Figura 35.** Verificación de la etiqueta de marcaje de poli-histidina y c-myc mediante el ensayo de western blot con los sdAbs.

**Figura 36.** Respuesta de los sdAbs contra los amastigotes axénicos.

**Figura 37.** Evaluación de la respuesta de los sdAbs contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares.

**Figura 38.** Digestión del ADN del fagémido de los candidatos con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* en agarosa al 1%.

**Figura 39.** Análisis de recombinantes en pET22b(+)-sdAb por PCR.

**Figura 40.** Alineamiento de las secuencias de los aminoácidos del candidato sdAb 6BIC contra la secuencia de aminoácidos del sdAb HEL4 con el programa CLC Sequence viewer versión 7.

**Figura 41.** Verificación de la pureza del sdAb 6B IC después del proceso de expresión y purificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.

**Figura 42.** Verificación de la etiqueta de marcaje de poli-histidina y c-myc mediante

el ensayo de western blot en los sdAb.

**Figura 43.** Respuesta de la dilución seriada de los sdAbs contra amastigotes axénicos.

**Figura 44.** Evaluación de la respuesta de los sdAb 6BIC y 3CIC frente a amastigotes axénicos y otros complejos celulares mediante ELISA.

**Figura 45.** Evaluación de la respuesta del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares mediante Western blot.

**Figura 46.** Evaluación de la respuesta del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y PBMC mediante inmunofluorescencia indirecta.

**Figura 47.** Patrón diferencial de señal del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y PBMC mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta detectada por proteína A-alexa 488.

**Figura 48.** Análisis de los sdAbs 11DAIV, 4DAI, 2EAV y 2CAI contra amastigotes de orejas de ratón infectado.

**Figura 49.** Análisis de los sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes extraídos de oreja de ratón.



## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| <b>AP</b>    | Ampicilina                                  |
| <b>ADN</b>   | Ácido desoxirribonucleico                   |
| <b>BSA</b>   | Albúmina sérica bovina                      |
| <b>CAP</b>   | Centros de atención primaria                |
| <b>CDR</b>   | Regiones hipervariables                     |
| <b>C</b>     | Dominio carboxi terminal constante          |
| <b>CH</b>    | Dominio constante de la cadena ligera       |
| <b>CL</b>    | Dominio variable de la cadena ligera        |
| <b>DGE</b>   | Dirección general de Epidemiología          |
| <b>DMSO</b>  | Dimetilsulfóxido                            |
| <b>ELISA</b> | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas |
| <b>HRP</b>   | Peroxidasa de rábano picante                |
| <b>IFI</b>   | Inmunofluorescencia indirecta               |
| <b>GPI</b>   | Glicosilfosfatidilinositol                  |
| <b>LAMP</b>  | Amplificación isotérmica mediada por bucle  |
| <b>LV</b>    | Leishmaniasis visceral                      |
| <b>LC</b>    | Leishmaniasis cutánea                       |
| <b>LCL</b>   | Leishmaniasis cutánea localizada            |
| <b>LCD</b>   | Leishmaniasis cutánea difusa                |
| <b>LCDi</b>  | Leishmaniasis cutánea diseminada            |
| <b>LCM</b>   | Leishmaniasis mucocutánea                   |
| <b>LPG</b>   | Lipofosfoglicano                            |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>MINSA</b> | Ministerio de Salud del Perú               |
| <b>KAN</b>   | Kanamicina                                 |
| <b>OD</b>    | Densidad óptica                            |
| <b>PBS</b>   | Tampón fosfato salino                      |
| <b>PCR</b>   | Reacción en cadenas de la polimerasa       |
| <b>PD</b>    | <i>Phage Display</i>                       |
| <b>PEN</b>   | Penicilina                                 |
| <b>PBMC</b>  | Células mononucleares de sangre periférica |
| <b>PAHO</b>  | Organización Panamericana de la Salud      |
| <b>RPMI</b>  | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>     |
| <b>SFB</b>   | Suero Fetal Bovino                         |
| <b>pH</b>    | Potencial de hidrogeniones                 |
| <b>sdAb</b>  | Anticuerpo de dominio único                |
| <b>sdAbs</b> | Anticuerpos de dominio único               |
| <b>TMB</b>   | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine             |
| <b>V</b>     | Dominio amino terminal variable            |
| <b>VH</b>    | Dominio variable de la cadena pesada       |
| <b>VL</b>    | Dominio variable de la cadena ligera       |
| <b>WHO</b>   | <i>World health organization</i>           |
| <b>μl</b>    | Microlitros                                |
| <b>μg</b>    | Microgramos                                |
| <b>ml</b>    | Mililitros                                 |

## RESUMEN

La leishmaniasis tegumentaria americana es un problema de salud pública en las Américas, donde Brasil y los países andinos, incluyendo el Perú, son los más afectados. La detección de ácidos nucleicos, ofrece métodos diagnósticos altamente sensibles y específicos, pero debido a sus altos costos y la necesidad de infraestructura especializada y personal, presenta problemas de implementación en las áreas rurales. Como alternativa prometedora se propone la tecnología de anticuerpos de dominio único (sdAb) con características notables como alta especificidad, solubilidad, estabilidad al calor y la posibilidad de mejora adicional a través de la tecnología recombinante. En el presente estudio, se usó una biblioteca sintética de sdAb PREDATOR junto a la tecnología de “*Phage Display*” para seleccionar un sdAb contra células enteras de amastigotes de *Leishmania*. Se seleccionó un sdAb denominado 6BIC, que en los ensayos de ELISA discriminó entre amastigotes extraídos de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis* y el correspondiente control no infectado. En dicho ensayo, no se observó respuesta cruzada cuando se analizaron los PBMC. Utilizando 6BIC para ensayos de detección de inmunofluorescencia indirecta, el sdAb mostró un patrón granulado en la membrana superficial de los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, aunque produjo una respuesta leve y difusa con los PBMC. Hasta el momento, este es el primer informe que documenta un sdAb, 6BIC, que es afín a los amastigotes de células enteras de *Leishmania*.

## ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis is a public health problem in the Americas, where Brazil and the Andean countries, including Peru, are the most affected. Detection of nucleic acids offer highly sensitive and specific diagnostic methods but due to its high costs and the need for specialized infrastructure and personnel, it presents implementation problems in rural areas. A promising alternative is the use of single-domain antibodies (sdAb) technology which uses recombinant antibodies with remarkable features such as very high specificity, solubility, heat-stability and the possibility for further improvement through recombinant technology. In the present study, we used an sdAb synthetic library fused to the gene III protein of M13 filamentous bacteriophage called PREDATOR to select an sdAb against whole cell *Leishmania* amastigotes. One sdAb, denominated 6BIC, was selected due to its capacity to discriminate between a mice ear infected with *L. (L.) amazonensis* and the non-infected control in an ELISA assay. In this assay, no cross reactivity was observed when PBMC were analyzed. Using 6BIC for indirect immunofluorescence detection assays, the sdAb showed a granulated pattern on the axenic amastigotes surface membrane although it rendered a slight and diffuse reactivity with PBMC. To the best of our knowledge, this is the first report documenting an sdAb, 6BIC, that presents affinity for *Leishmania* whole cell amastigotes.

**Key words:** *Leishmania*, amastigote, *Phage Display*, *single-domain antibodies*.

## I. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad con diferentes manifestaciones clínicas, que es causada por el parásito del género *Leishmania* y que afecta mayormente a zonas rurales de países en desarrollo, incluido el Perú (Okwor *et al.*, 2016). Entre las manifestaciones clínicas a nivel mundial, se tiene: la leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y leishmaniasis mucocutánea (LMC) (Desjeux, 2004). En el Perú, existen las formas de LMC y LC, siendo esta última la que engloba un porcentaje mayor al 90% de los casos de leishmaniasis reportados (DGE-MINSA, 2015, 2016).

La población de alto riesgo de infección con leishmaniasis, se encuentra en zonas rurales del Perú y sólo tienen acceso a los centros de atención primaria de salud (CAP), los cuales sólo cuentan con el método de diagnóstico parasitológico por tinción giemsa (MINSA, 2010), ya que otros métodos modernos de diagnóstico presentan muchas desventajas en su implementación en los CAP. El método parasitológico por tinción giemsa, considerado como el método estándar; presenta una baja sensibilidad y necesita de personal técnico experimentado, por lo que es una necesidad imperante la búsqueda de nuevas herramientas biotecnológicas que optimicen la detección de antígenos de *Leishmania* por los métodos convencionales directos.

Dentro de las herramientas biotecnológicas actuales para el diagnóstico, se encuentran los anticuerpos que van desde los policlonales hasta los fragmentos de anticuerpos. Entre los fragmentos de anticuerpos estudiados se encuentran los anticuerpos de

dominio único (sdAb) que presentan muchas ventajas en comparación al resto de tipos de anticuerpos como son la resistencia a la agregación, alta estabilidad y fácil producción en sistemas bacterianos (Muyldermans, 2013). Dichos fragmentos al ser manipulados genéticamente dieron lugar a las denominadas “bibliotecas” que al combinarse con la tecnología *Phage Display* (PD) generaron las bibliotecas de fagos-sdAbs. Cabe mencionar, que la tecnología PD se basa en la unión del ADN del sdAb a los genes de las proteínas de cubierta de un fago, generando así la expresión del anticuerpo en su cubierta (Zhao *et al.*, 2016).

Por lo expuesto, la presente investigación planteó el uso de “células enteras” del estadio amastigote en la selección de clones de fagos que expresan sdAbs mediante la tecnología PD a partir de la biblioteca sintética “PREDATOR”, cedida por el Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus-Dinamarca. Posteriormente, se subclonaron aquellos sdAbs seleccionados y se expresaron como sdAbs solubles en *Escherichia coli* BL21g. Finalmente se evaluó su capacidad de detección de los sdAbs solubles contra amastigotes axénicos producidos “*in vitro*” y extraídos de infecciones en orejas de ratones BALB/c infectados con *Leishmania*, con el objetivo de desarrollar un panel de sdAb con potencial uso en el diagnóstico directo de leishmaniasis.

## II. Planteamiento del problema

A nivel mundial, la leishmaniasis es una enfermedad considerada como desatendida a pesar de ser un problema de salud pública y con 310 millones de personas con riesgo de infección (WHO, 2016). Entre las manifestaciones mencionadas, la LC es la forma clínica más predominante en el mundo, donde Brasil, Colombia y Perú se encuentran entre los 10 países que concentran del 70.0 hasta el 75.0% de la incidencia estimada mundial (Alvar *et al.*, 2012).

A nivel nacional, existen localidades fuera de la ciudad que sólo cuentan con puestos de salud de nivel I o también denominados CAP (Kroeger, 1987), cuya población se encuentra más expuesta a la infección por leishmaniasis. Los CAP sólo se encargan del diagnóstico de la LC mediante tinción Giemsa del frotis de la lesión (método convencional directo parasitológico). Luego, las muestras son enviadas a un laboratorio intermedio que a su vez las deriva a un laboratorio regional y finalmente a un laboratorio de referencia para la confirmación del diagnóstico (MINSa, 2000) que puede demorar de un mes a más. El retraso en el diagnóstico afecta a dicha población, ya que en algunos casos tienen que caminar largos tramos para llegar a los CAP y no pueden tener acceso al tratamiento hasta tener un diagnóstico confirmatorio, perjudicando así su estilo de vida. Además, el método de tinción Giemsa de frotis, considerado como prueba definitiva, reporta una baja sensibilidad (en promedio del 45%) y depende de muchos factores como: la experiencia del personal técnico, la toma de muestra y la cantidad de parásitos presentes (Andresen *et al.*, 1996; Aviles *et al.*, 1999; Weigle *et al.*, 2002). Así mismo dicho método depende de la calidad de la tinción

de los frotices ya que se puede generar precipitados por el colorante, evitando así la visualización correcta del parásito al microscopio pudiendo confundir un resultado por la señal de fondo de la coloración.

Por otro lado, las muestras se trasladan para ser analizadas mediante otros métodos parasitológicos, como la examinación histopatológica de biopsias y los cultivos “*in vitro*”, sin embargo estos métodos tienen una sensibilidad de 33.0-76.0% y 45.0% respectivamente (Andresen *et al.*, 1996; Aviles *et al.*, 1999). Entre otras desventajas cabe mencionar que los cultivos “*in vitro*” están bajo riesgo de contaminación cuando no cuentan con las áreas adecuadas y son necesarios largos períodos de incubación para la obtención de un resultado. Finalmente, el método histopatológico es un método doloroso para el paciente, ya que implica la extracción de un pedazo de la lesión y cuenta con un procedimiento extenso que necesita de un especialista para el análisis de los resultados.

Los métodos indirectos serológicos se pueden realizar sólo en los laboratorios regionales. Aunque son métodos más sencillos, no son eficientes en el diagnóstico de LC, principalmente por su reacción cruzada con otras enfermedades como la enfermedad de chagas, toxoplasmosis y esporotricosis (Celeste *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 1996; Sarkari *et al.*, 2014; Szargiki *et al.*, 2009).

Los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, PCR en tiempo real y PCR-RFLP, cuentan con muchas ventajas como rapidez, alta sensibilidad y especificidad (Reithinger *et al.*, 2007). Sin embargo, sólo se pueden implementar en los laboratorios nacionales de referencia debido a sus



requerimientos de infraestructura, personal y elevados costos. Lo que obliga a la población afectada a realizar viajes extensos a la ciudad o incluso a la capital para poder acceder a dichos métodos de diagnóstico perjudicando así su economía. Un nuevo método molecular denominado amplificación isotérmica medida por bucle (LAMP), ha ido innovando ya que no necesita muchos requerimientos. No obstante, Thekiso *et al.* (2009) reportó que los componentes del método LAMP son eficientes hasta 30 días de almacenamiento de 25–37°C, por lo que se necesita un sistema de refrigeración que es no es factible en los CAPs.

Debido a que las pruebas de diagnóstico de leishmaniasis vigentes presentan problemas de sensibilidad, especificidad y/o factibilidad en su implementación en los CAPs; en este trabajo se propone identificar, seleccionar (mediante la tecnología PD y biblioteca de sdAb) y expresar sdAbs como posibles herramientas biotecnológica que optimicen un rápido y efectivo diagnóstico directo de la leishmaniasis.

### **III. Marco teórico**

#### **3.1 Leishmaniasis y sus manifestaciones clínicas**

La leishmaniasis es el conjunto de enfermedades endémicas causadas por los parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Está distribuida a nivel mundial con un promedio de mil millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2016). Existen diferentes manifestaciones clínicas cuya expresión depende de diversos factores que son: (i) la localización del parásito, (ii) el tropismo de la especie, (iii) el medio ambiente y (iv) el estado inmunológico del hospedero.

Las principales manifestaciones clínicas reportadas a nivel mundial de acuerdo a su distribución geográfica en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África) y el Nuevo Mundo (América), son:

##### **3.1.1 Leishmaniasis Visceral (LV)**

En el viejo mundo, la LV no es la manifestación más común a nivel mundial, pero si es una condición seria, que al no tratarse puede ser fatal. Entre las especies causantes de la misma se tiene a *L. (Leishmania) donovani* y *L. (L.) infantum*; y se puede clasificar en las formas: (i) endémica, (ii) esporádica y (iii) epidémica (WHO, 2010). De las mencionadas, la forma endémica se manifiesta de manera crónica con los siguientes síntomas clínicos: fiebre, malestar, escalofríos, pérdida de peso, anorexia, incomodidad en el hipocondrio derecho, hepatomegalia y palidez en las mucosas de las membranas (Figura 01) (WHO, 2010). Por otro lado, la forma esporádica es la forma aguda, cuyos síntomas son la aparición abrupta de fiebre con complicaciones como la anemia hemolítica aguda, daño renal agudo y mucosa hemorrágica (WHO, 2010).

En el Nuevo Mundo, mayormente en Brasil, la LV es causada sólo por la especie *L. (L.) infantum*, la enfermedad es clínicamente similar a la del Viejo Mundo con una frecuencia mayor de infecciones asintomáticas o leves (WHO, 2010).

### **3.1.2 Leishmaniasis Cutánea (LC):**

En el Viejo Mundo, la LC es la forma más común y es causada por las especies *L. (L.) infantum*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. aethiopica (L.)* y *L. (L.) donovani*. La enfermedad de acuerdo a los síntomas reportados, se puede clasificar en dos formas: LC localizada (LCL) y la LC difusa (LCD). La LCL inicia como una pápula o nódulo que avanza progresivamente hacia la generación de una lesión ulcerada de forma oval con un borde definido elevado (WHO, 2010). Además, los amastigotes se desarrollan en el sitio de la inoculación generando la liberación de citoquinas con una reacción celular que resulta en la aparición de la lesión (Kumar, 2013). Por otro lado la LCD es la variante crónica y progresiva causada por *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) major*, ésta forma se caracteriza por la presencia de numerosas lesiones diseminadas no ulceradas en la piel, que presentan un número masivo de parásitos (Hashiguchi *et al.*, 2016).

En el Nuevo Mundo, se presenta la LCL, LCD y la LC diseminada (LCDi) (Figura 02). En el caso de la LCL se caracteriza por la presencia de lesiones como nódulos o pápulas similares a las del Viejo Mundo; las cuales son ovales, indoloras, con una costra central y son causadas por las especies del subgénero *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)* (Goto *et al.*, 2010; WHO, 2010). La LCD comparte los mismos signos que la forma del Viejo Mundo, la diferencia radica en la especie involucrada, en este caso es causada por *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana* (Hashiguchi *et al.*, 2016; Kumar,

2013). La LCDi también presenta numerosas lesiones pero se diferencia de la LCD por dos factores: (i) las lesiones son ulceradas que pueden llegar a necrosar y (ii) las lesiones presentan un número escaso número de parásitos. La LCDi es causada por el complejo de *L. (V.) braziliensis* y el complejo *L. (L.) mexicana* (Hashiguchi *et al.*, 2016; WHO, 2010).

### **3.1.3 Leishmaniasis Mucosa (LM):**

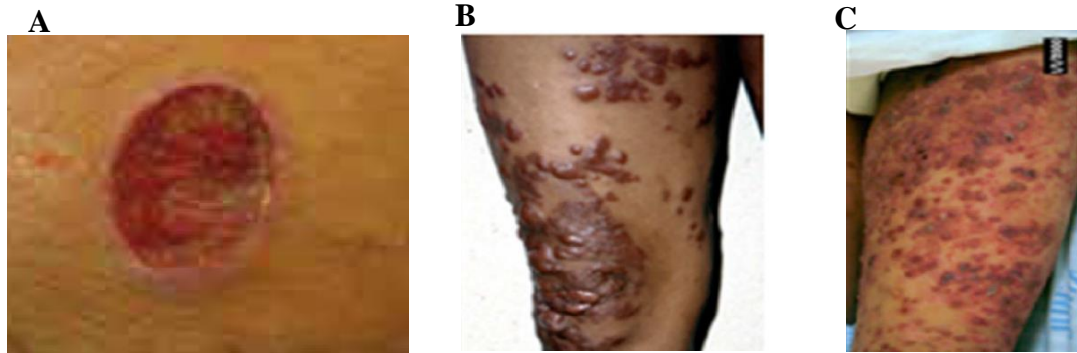
En el Viejo Mundo, las lesiones mucosas no son muy frecuentes. Sin embargo, se ha observado que pacientes con LV coinfectados con VIH pueden desarrollar lesiones en la boca, nariz y mucosa genital (WHO, 2010).

### **3.1.4 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC):**

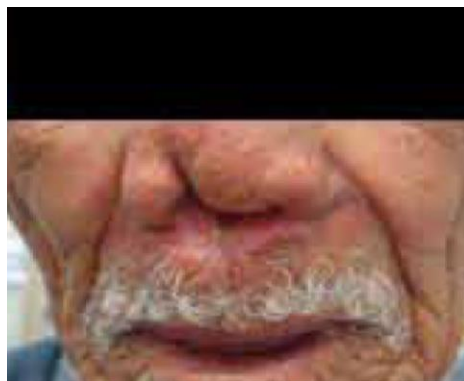
Es la forma presente en el Nuevo Mundo y es causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* (WHO, 2010). Se caracteriza por la aparición de nódulos e infiltrados en el cartílago nasal que pueden llevar a la destrucción de diversos tejidos como el tabique nasal, tejidos mucosos de la boca y el tracto respiratorio superior (Figura 03); causando así lesiones deformantes que pueden conducir a una mutilación severa (Kumar, 2013; Pace, 2014; WHO, 2010). Los amastigotes en el proceso de infección se propagan hacia la mucosa y generan así las lesiones (Kumar, 2013).



**Figura 01.** Manifestación clínica de leishmaniasis visceral. Se observa dos casos con presencia de hepato-esplenomegalia (Imagen reproducida de Kumar *et al.*, 2012).



**Figura 02.** Manifestación clínica de la leishmaniasis cutánea. (A) Lesión típica de LCL. (B) Lesiones en forma de erupciones de LCD. (C) Lesiones con parcial ulceración de LCDi. (Imágenes reproducidas de Hashiguchi *et al.*, 2016).



**Figura 03.** Manifestación clínica de la leishmaniasis mucocutánea con una lesión destructiva en la nariz (Imagen reproducida de Goto *et al.*, 2010).

### **3.2 Distribución Geográfica y epidemiología de la leishmaniasis**

A nivel mundial, la leishmaniasis afecta a millones de personas y su transmisión se ha reportado en un total de 98 países con un promedio de 0.2 a 0.4 millones de casos de LV y 1.2 millones de LC por año (Alvar *et al.*, 2012). En el reporte técnico del 2012 impulsado por WHO, que engloba la estimación mundial de leishmaniasis en el mundo (Figura 04), se menciona: (i) El 90% de los casos de LV se concentran en 6 países que son la India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil; y (ii) El 70-75% de LC lo conforman 10 países que son Afganistán, Algeria, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, North Sudan, Costa Rica y Perú como se muestra en la Figura 04 (Alvar *et al.*, 2012).

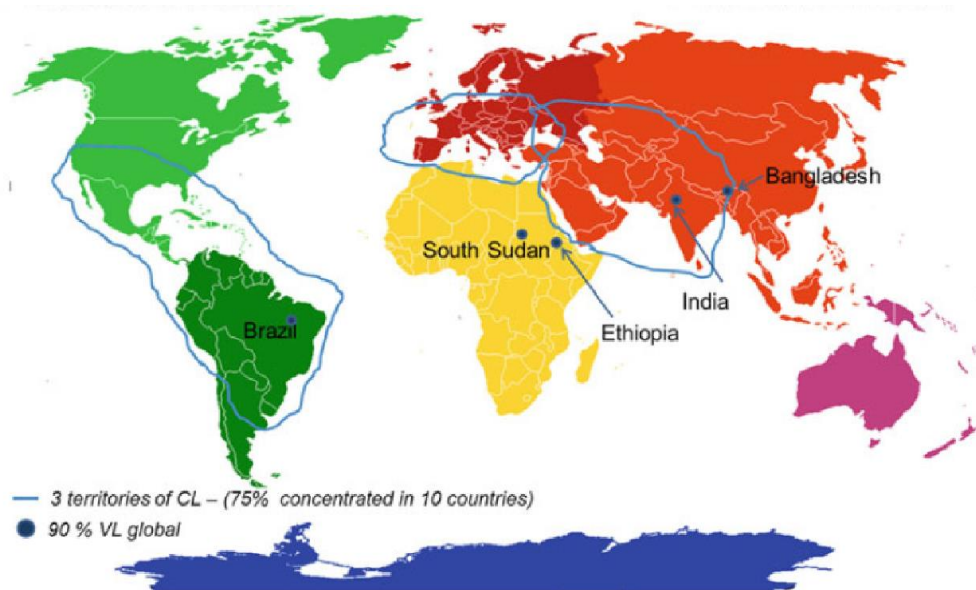
En el registro epidemiológico del 2016 de la WHO, según la información recolectada hasta el 2014, se reportó un total de 30 758 casos de LV y 153 027 casos de LC, cuyas tasas más altas de incidencia fueron de 35.63 casos /10 000 hab. y 22.74 casos/10 000 hab., respectivamente (WHO, 2016).

A nivel de América, según el informe publicado por PAHO y WHO, en el período 2001-2014, se manifiesta que: (i) La LV es endémica en 12 países y cuenta con 3 480 casos por año y (ii) La LC y LMC se presenta en 17 países con un promedio anual de 56 989 casos. De todo lo estipulado se resalta que Brasil concentra el 95.0% de los casos de LV y junto con Perú y Bolivia el 81.25% de los casos de LC y LMC (PAHO-WHO, 2016).

En el Perú, según el reporte epidemiológico del MINSA en la semana 50 del 2016, se indica una tasa de incidencia de 19,13 casos/100 000 hab. con un total de 5556 casos

confirmados de LC y un total de 416 casos confirmados de LMC con una tasa de incidencia de 1,47 casos/100 000 hab. (DGE-MINSA, 2016). Los cuales se concentran mayormente en los departamentos de Junín, Cusco, Madre de Dios, Piura, Cajamarca, Lima y Ancash; siendo el departamento de Ancash el que presentó el mayor número de casos (764) (DGE-MINSA, 2016).

Existen diversas especies de *Leishmania* que generan la leishmaniasis en el mundo, pero en el Perú se reportan 3 especies predominantes y de importancia epidemiológica. Entre estas se encuentran: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) guyanensis*; todas ellas se encuentran dentro del complejo de especies *L. (V.) braziliensis*. Aunque con menor incidencia también se han reportado *L. (V.) lainsoni* y *L. (L.) amazonensis* del complejo *L. (L.) mexicana* (Grimaldi *et al.*, 1989; Lucas *et al.*, 1998; Victoir *et al.*, 2003; WHO, 2010). La distribución de estas especies varía entre regiones y departamentos, siendo *L. (V.) braziliensis* la especie predominante en la selva amazónica a diferencia de *L. (V.) peruviana* que predomina en la sierra (Tabla 01).



**Figura 04.** Distribución a nivel mundial de la leishmaniasis. La franja celeste engloba los países que concentran entre el 70-75% de LC y los puntos azules el 90% de LV (Imagen reproducida de Santos *et al.*, 2014).



**Tabla 01.** Distribución de las especies de *Leishmania* en el Perú de acuerdo a las regiones naturales y departamentos.

| <b>Especies</b>             | <b>Distribución por regiones naturales</b>                                      | <b>Distribución Geográfica por departamentos</b>  |
|-----------------------------|---|---|
| <i>L. (V.) braziliensis</i> | En la Selva Amazónica y casos reportados en la región centro-este de los Andes. | San Martín, Ancash, Cusco, Junín, Lima, Loreto, Ucayali, Madre de Dios, Pasco, Piura, Loreto, Huánuco, Amazonas, Ayacucho y Apurímac. |
| <i>L. (V.) peruviana</i>    | En la Sierra  | Cajamarca, Huánuco, La Libertad, Lima, Piura y Ancash.  |
| <i>L. (V.) guyanensis</i>   | En la Selva Amazónica y casos reportados en la región centro-este de los Andes. | Amazonas, Ancash, Cusco, Huánuco, Junín, San Martín, Ucayali y Lambayeque.  |
| <i>L. (V.) lainsoni</i>     | En la Selva Amazónica   | Ayacucho, Cusco, Huánuco, Pasco, San Martín, Lima y Ancash.   |
| <i>L.(L.) amazonensis</i>   | En la Selva Amazónica   | Amazonas, Ayacucho, Junín y Ucayali.  |

Fuente: Grimaldi *et al.*, 1989; Lucas *et al.*, 1998; Victoir *et al.*, 2003; Arevalo *et al.*, 2007; Odiwuor *et al.*, 2012; Veland *et al.*, 2012.

### 3.3 El parásito de *Leishmania*

#### 3.3.1 Características generales y ciclo de vida de *Leishmania*

El protozoo causante de la leishmaniasis pertenece al género *Leishmania* del orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae, que se caracteriza en comparación a otros eucariotas por la presencia de glicosomas y un kinetoplasto con un ADN compuesto por dos tipos de ADN circular llamados minicírculos y maxicírculos (Lopes *et al.*, 2010).

El género *Leishmania* cuenta con dos estadios en su ciclo biológico que son: (i) el estadio amastigote o la forma intracelular y (ii) el estadio promastigote o la forma extracelular (Pace, 2014). El estadio promastigote se localiza en el intestino del insecto vector hembra del género *Phlebotomus spp.* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomyia spp.* (en el Nuevo Mundo) (Kumar, 2013). Los promastigotes se encuentran bajo dos formas que son los promastigotes procíclicos y los promastigotes metacíclicos (Lopes *et al.*, 2010). Los promastigotes procíclicos se caracterizan por estar en su forma replicativa, no son infectivos y se encuentran en el intestino medio del vector (Jeronimo *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 2010); mientras que los metacíclicos son formas infectivas y se encuentran en la probóscide del vector (Jeronimo *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 2010).

En el proceso de infección, el vector hembra durante su ingesta de sangre para su reproducción, inyecta los promastigotes metacíclicos al hospedero, dichos promastigotes son fagocitados mediante unión a receptores del sistema del complemento de los macrófagos y los glicoconjugados como lipofosfoglicano (LPG) y GP63 del promastigote metacíclico (Lodge *et al.*, 2008). En este proceso se da lugar

a la transformación del estadio promastigote al estadio amastigote, el cual se sitúa dentro de la vacuola parasitófora del sistema fagocitario del hospedero. Dentro de este sistema gracias a la regulación genética, el amastigote es capaz de soportar las condiciones de la vacuola parasitófora como son un pH ácido de 4.5 – 6.0 y una temperatura alta de 31-35°C (en las lesiones de piel) y 37°C en los órganos del hospedero (Zilberstein *et al.*, 1994). Una vez dentro del macrófago, el amastigote se multiplica, llevando a la célula a la lisis y liberando los amastigotes, los cuales infectan nuevas células del sistema fagocitario, generando así la continuación del ciclo (Kumar, 2013).

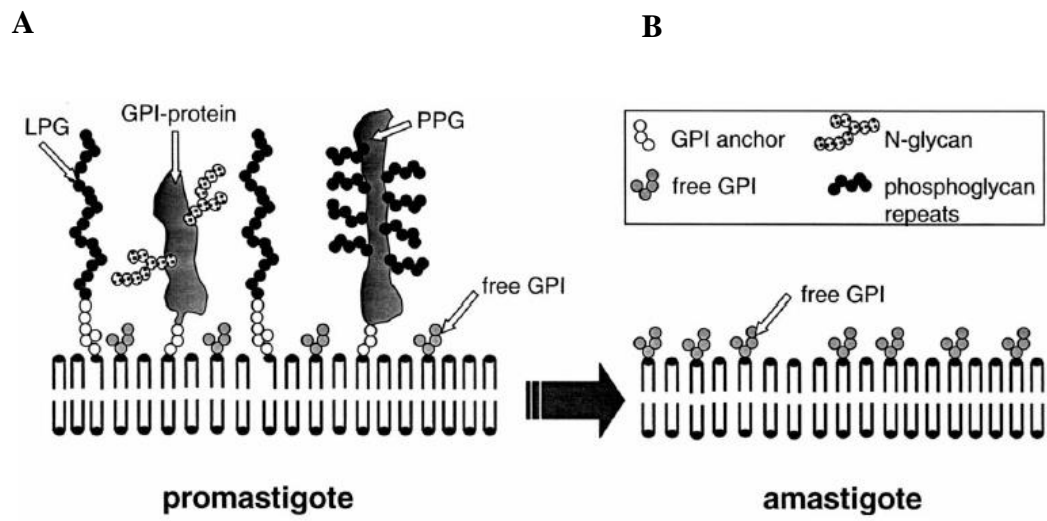
### **3.3.2 Aspectos Morfológicos de los estadios de *Leishmania***

El promastigote se caracteriza por tener una forma alargada, móvil, con una longitud de 10-15 µm, un diámetro de 2-3 µm y presencia de un flagelo que se extiende fuera de la célula (Jeronimo *et al.*, 1992; Pace, 2014). En estudios realizados en *L. (L.) major* se encontraron diferencias entre las formas procíclicas y metacíclicas de los promastigotes (Pimenta *et al.*, 1991). Siendo los promastigotes procíclicos una población de células inmaduras en estado replicativo, con un flagelo corto, núcleo redondeado no condensado, una bolsa flagelar vacía y presenta además células en proceso de maduración (Pimenta *et al.*, 1991). Mientras que los promastigotes metacíclicos presentan células no replicantes, con un flagelo largo, núcleo elongado con cromatina condensada, el kinetoplasto se muestra de forma condensada, un glicocálix grueso, una bolsa flagelar con material secretorio, y abundantes gránulos citoplasmáticos (Pimenta *et al.*, 1991).

Por otro lado, el estadio amastigote tiene una forma oval o redondeada no móvil con un diámetro de 2-3  $\mu\text{m}$ , cuenta con un flagelo; sin embargo, este se encuentra dentro de un bolsillo flagelar y no se extiende (Jeronimo *et al.*, 1992). Además, presenta un núcleo redondeado, sin un glicocalix grueso, un citoplasma condensado con gránulos intracelulares, un kinetoplasto compacto y un bolsillo flagelar con material secretorio (Pimenta *et al.*, 1991).

### **3.3.3 Aspectos Bioquímicos y antígenos de superficie**

El proceso de transformación de promastigote-amastigote comprende un cambio diferencial en la composición de los antígenos de superficie que generan nuevos blancos de estudio (Naderer *et al.*, 2004), ya que ambos estadios muestran una superficie celular diferencial (Figura 05). Ambos estadios están compuestos por los glicosilfosfatidilinositoles (GPIs) anclados a proteína o de forma libre como glicolípidos (Mcconville *et al.*, 1990). Se ha reportado que la expresión de dos tipos de GPI, anclados a proteína que son LPG, presente de forma abundante en el promastigote, y la proteína GP63; disminuyen drásticamente en el amastigote (Bahr *et al.*, 1993; Mcconville *et al.*, 1990; Mcconville *et al.*, 1991). Por otro lado, los amastigotes adquieren glicoesfingolípidos del macrófago del hospedero en el proceso de infección, incorporándolos a su membrana plasmática (Gerhard Winter *et al.*, 1994). Otra diferencia entre ambos estadios, a nivel de membrana, es la sobreexpresión de la glicoproteína de superficie (amastina) en amastigotes, proteína detectada en estudios con *L. (L.) donovani* (Wu *et al.*, 2000).



**Figura 05.** Representación esquemática de la superficie celular de *Leishmania*. **(A)** La forma extracelular promastigote que se encuentra en el vector insecto, en la cara externa muestra diversas clases de macromoléculas como LPG, glicolípidos anclados a GPI, proteofosfoglicanos y GPI libres. **(B)** La forma intracelular amastigote en el hospedero, presenta GPI libres con una expresión disminuida de macromoléculas ancladas a este glicolípidos. (Imagen reproducida de Ilgoutz *et al.*, 2001).

### **3.4 Diagnóstico de LC y problemática en los centros de atención primaria**

#### **(CAP)**

El diagnóstico de la leishmaniasis incluye los métodos de diagnóstico convencional directo (parasitológicos o microscópicos), los métodos de diagnóstico indirecto (serológicos o inmunológicos) y los métodos de diagnóstico moderno (molecular). A continuación, se describe dichos métodos de forma detallada en el ámbito del diagnóstico de la LC en el Nuevo Mundo (Continente Americano).

#### **3.4.1 Métodos de diagnóstico convencional directo**

Los métodos microscópicos permiten detectar la presencia del parásito en muestras de pacientes por lo que son conocidos como métodos directos. Existen tres métodos: (i) la examinación microscópica del parásito por tinción con Giemsa del frotis de la lesión, (ii) revisión histopatológica de una biopsia de lesión y (iii) la observación del crecimiento del parásito en cultivos con medio bifásico u monofásico a partir del aspirado de la lesión (Allahverdiyev *et al.*, 2004; Andresen *et al.*, 1996). Estos métodos cuentan con alta especificidad pero presenta diversas desventajas que impiden su uso en el diagnóstico de la LC en los CAP.

La examinación microscópica por tinción Giemsa de un frotis es considerado como el método estándar en los CAP (MINSA, 2000). El procedimiento consiste en realizar un raspado por el borde de la lesión con un bisturí, cepillo pequeño o micropipeta y la muestra es extendida sobre un portaobjetos para luego ser teñida con colorante Giemsa (MINSA, 2000; Palma *et al.*, 1991). En muestras de estados agudos de la enfermedad cuenta con un rango de sensibilidad del 42,0%-80,0%, (Allahverdiyev *et al.*, 2004;

Andresen *et al.*, 1996; Aviles *et al.*, 1999; Lemrani *et al.*, 2009; Rasti *et al.*, 2016; Weigle *et al.*, 2002), dicha sensibilidad desciende en estados crónicos de la enfermedad. En el Perú, en un estudio con 279 pacientes se observó un porcentaje de positividad de sólo el 4,7% (Davies *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos con este método dependen de muchos factores, como la experiencia del personal técnico, la toma de muestra y el tiempo de la lesión. En lesiones que tienen más de 6 meses la sensibilidad puede descender hasta 4,8% (Weigle *et al.*, 2002).

La examinación histopatológica se realiza a partir de lesiones (biopsias) fijadas en parafina, que son diseccionadas mediante un micrótomo y luego fijadas en un portaobjetos para realizar la tinción por hematoxilina-eosin. La sensibilidad de este método oscila entre 33-76% (Andresen *et al.*, 1996; Aviles *et al.*, 1999) y necesita de un personal especializado (médico patólogo) en el análisis, así como de reactivos y equipos especializados carentes en los CAP (Davies *et al.*, 1997).

Los cultivos “*in vitro*” con medios nutritivos, ya sean monofásicos o bifásicos, cuentan con una sensibilidad entre el 40-72% y se realizan a partir de triturados de biopsias y aspirados (Allahverdiyev *et al.*, 2004; Andresen *et al.*, 1996; Aviles *et al.*, 1999; Lemrani *et al.*, 2009; Rasti *et al.*, 2016). La aplicación de este método en los CAP es limitada por la necesidad de un laboratorio de investigación, área estéril de trabajo, suministro continuo de material, medio de cultivo empleado, manejo especial de desechos biológicos, prolongados tiempos de incubación y probabilidad de contaminación (Davies *et al.*, 1997).

### 3.4.2 Métodos de diagnóstico convencional indirecto

Los métodos serológicos se basan en la identificación de anticuerpos anti-*Leishmania* en el suero de los pacientes para lo cual se utilizan diversos métodos como son: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de intradermoreacción.

El ensayo de ELISA muestra una buena exactitud diagnóstica de LV, sin embargo, en el caso de LC se observa una alta variabilidad en la sensibilidad y especificidad. Entre los reportes analizados, el ensayo de ELISA posee una sensibilidad entre 64-96% y una especificidad entre 49-92%; sin embargo, puede presentar reacción cruzada con las siguientes enfermedades: enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, esporotricosis, enfermedad reumática y lepra (Barroso-freitas *et al.*, 2009; Cataldo *et al.*, 2010; De Pádua Vidigal *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2006; Sarkari *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2015; Szargiki *et al.*, 2009). Dicho ensayo aunque no es invasivo, presenta desventajas, como la necesidad de un equipo especializado para el análisis, variación en los resultados de acuerdo al tipo o especie del antígeno y producción continua del antígeno en un laboratorio especializado.

Las pruebas de diagnóstico por inmunofluorescencia indirecta consisten en poner en contacto el suero del paciente contra los parásitos, detectando fluorescencia evidenciando así la interacción. La prueba reporta una sensibilidad y especificidad entre 58-86% y 75-89% respectivamente, esta variabilidad depende de la especie y el tipo de estadio utilizado. Entre sus limitaciones, se encuentra el requerimiento de un microscopio de fluorescencia, entrenamiento técnico y experiencia del observador.



Además, se reporta reacción cruzada con la enfermedad de Chagas (Barroso-freitas *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014; Sarkari *et al.*, 2014).

En la prueba de intradermo-reacción se mide la inmunidad celular causada por la inoculación de extractos del parásito de *Leishmania* en la piel. En las diferentes investigaciones la sensibilidad es de 64-96% y la especificidad es de 62%. Una de sus principales limitaciones es la reacción cruzada con la enfermedad de esporotricosis y la generación de respuesta positiva años después de la resolución de la enfermedad (De Lima Barros *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2014; Skraba *et al.*, 2015). Adicionalmente los CAP no cuentan con capacidad de producción del antígeno para la prueba.

### **3.4.3 Métodos de diagnóstico modernos**

El método molecular se basa en la detección del ADN del parásito por medio de diversas tecnologías como PCR, PCR en tiempo real, PCR-RFLP y LAMP. Dichas tecnologías cuentan con una especificidad y una sensibilidad mayor al 85%, pueden detectar a *Leishmania* en infecciones con escaso número de parásitos (Bensoussan *et al.*, 2006; Espinosa *et al.*, 2009; Lemrani *et al.*, 2009; Rasti *et al.*, 2016; Reithinger *et al.*, 2007). Además los métodos moleculares tienen diversas aplicaciones adicionales como la tipificación del parásito, cuantificación de la carga parasitaria y determinación de la viabilidad. Sin embargo, las pruebas moleculares presentan múltiples limitaciones, los procedimientos son costosos, necesitan de una infraestructura especializada, equipos complejos especializados, uso de reactivos mutagénicos o tóxicos y personal técnico con conocimientos específicos (Anthony *et al.*, 1987; Reithinger *et al.*, 2007). Estas limitaciones hacen inaccesible la implementación de las

pruebas moleculares en los CAP.

### **3.5 Antígenos utilizados en métodos de diagnóstico de LC**

Existe una variedad de antígenos utilizados en los métodos de diagnóstico de LC y LMC, los cuales muestran una alta variabilidad en los métodos convencionales indirectos. Se ha observado que los resultados en las pruebas de diagnóstico varían de acuerdo a la especie, estadio y proteína de *Leishmania* utilizada como antígeno. A nivel de las especie, se reporta que *L. (V.) braziliensis* muestra mejores resultados con una sensibilidad y especificidad por encima del 90% en comparación con *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mayor*, las cuales presentan valores entre el 56-100%, en las pruebas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta (Barroso-freitas *et al.*, 2009; Szargiki *et al.*, 2009). Dichos estudios se realizaron con antígenos del estadio promastigote, en el caso del uso de antígenos del estadio amastigote se reporta que la especificidad disminuye hasta un 62.7% en el caso de *L. (L.) mayor* (Sarkari *et al.*, 2014). En otros reportes, se analizó el antígeno soluble de fragmentos de membrana, antígenos secretados o excretados y proteínas recombinantes (Cataldo *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015). Entre las proteínas recombinantes analizadas se tiene la triparedoxin peroxidasa, el factor de iniciación eucariótico 5A, enolasa, b-tubulina y las proteínas de choque térmico HSP83 con valores de respuesta de positividad mayores a 90% (Duarte *et al.*, 2015; Menezes-souza *et al.*, 2014). En las pruebas de ELISA se ha observado que la variabilidad de la sensibilidad y especificidad depende de la naturaleza del antígeno.

### **3.6 Tecnología de anticuerpos**

#### **3.6.1 Estructura del anticuerpo**

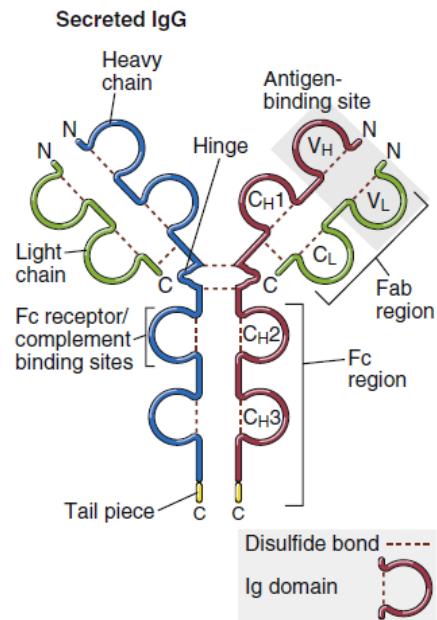
Los anticuerpos son glicoproteínas producidas por linfocitos B diferenciados (células plasmáticas) que se caracterizan por su diversidad y su particular especificidad por su antígeno (Abbas *et al.*, 2012). Existen diversos tipos de anticuerpos como son IgM (pentámeros), IgG (monómero), IgA (dímero), IgD (monómeros) y IgE (monómero), cuya unidad es un monómero básico de inmunoglobulina con algunas diferencias (Maynard *et al.*, 2000). A continuación se detallan las características generales del monómero del anticuerpo IgG, que es el más estudiado.

La estructura normal de un anticuerpo como el IgG (Figura 06) tiene forma de “Y” y consta de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que son idénticas (Kindt *et al.*, 2007). La cadena ligera cuenta con un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL), mientras que la cadena pesada en general cuenta con un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH 1-3) (Padlan, 1994). Dichas cadenas están compuestas por regiones o dominios que son unidades homólogas que constan de dos hojas beta anti-paralelas unidas por un puente disulfuro (Maynard *et al.*, 2000). Además, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro por los residuos de cisteína entre el carboxilo terminal de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada; así como las cadenas pesadas están unidas por enlaces disulfuro por los dominio CH2 cerca de la región llamada bisagra (Padlan, 1994).

En cada cadena el dominio amino terminal (V) posee una alta variabilidad lo que le confiere la habilidad de reconocimiento de antígenos mientras que el dominio carboxilo

terminal (C) es constante (Abbas *et al.*, 2012). De acuerdo a diversos estudios con cortes proteolíticos, se puede dividir el anticuerpo en dos diferentes fragmentos funcionales: que son la región Fab (Fragmento de unión al antígeno) compuesta por la cadena ligera (VL mas CL) asociada al fragmento VH-CH1 de la cadena pesada (Fragments *et al.*, 1979); y la región Fc (fragmento cristalizante) compuesto por los dominios CH2-CH3 de ambas cadenas pesadas (Figura 06) (Padlan, 1994).

Como se menciona líneas arriba, los dominios variables de cada cadena poseen regiones hipervariables llamadas también CDR (regiones determinantes complementarias), como: CDR1, CDR2 y CDR3 (Abbas *et al.*, 2012); entre dichas regiones se encuentran regiones andamios que se denominan como marcos conservados o FR. En conjunto, los dominios variables de cada cadena y los marcos conservados o FR forman una superficie donde el antígeno se puede unir (Wu *et al.*, 1970).



**Figura 06.** Estructura de un anticuerpo. Diagrama esquemático de un anticuerpo IgG donde se muestra el sitio de unión al antígeno (formado por la yuxtaposición de los dominios VL y VH). Y las regiones C de la cadena pesada están al final de la cola. (Imagen reproducida de Abbas *et al.*, 2012).

### **3.6.2 Relación antígeno – anticuerpo**

La unión antígeno-anticuerpo está mediada por las regiones CDR de los dominios variables, siendo en total un número de 6 regiones, 3 en la cadena pesada y 3 en la ligera, que en conjunto forman una estructura flexible capaz de unirse al antígeno (Abbas *et al.*, 2012). Dicha unión se basa en la complementariedad de acuerdo a las propiedades físicas y químicas en la superficie de estas regiones (Padlan, 1994). Entre dichas propiedades se tiene la conformación, disposición y naturaleza de las cadenas laterales en cada CDR así como las interacciones van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas que se forman en la unión antígeno-anticuerpo (Maynard *et al.*, 2000; Padlan, 1994). Entre las tres regiones CDR, la región CDR3 cumple un rol importante en la unión al antígeno ya que es la que muestra la mayor variabilidad (Kabat *et al.*, 1992), además de que a nivel de diversas especies muestra una gran diversidad en su longitud y conformación (Wu *et al.*, 1993).

### **3.6.3 Anticuerpos monoclonales y recombinantes**

Con fines terapéuticos y de diagnóstico, los anticuerpos fueron producidos mediante la inmunización de sistemas “*in vivo*” (animales) con la producción de anticuerpos policlonales; pero este proceso fue revolucionado por la técnica desarrollada por Kohler y Milstein (1975), denominada en la actualidad como hibridoma. La tecnología de Hibridoma está basada en la fusión de una línea celular inmortal de mieloma con linfocitos B de un animal inmunizado, generando así hibridomas; donde cada clon produce una cantidad necesaria de sólo un anticuerpo denominado como anticuerpo monoclonal, el cual es específico contra el antígeno usado en la inmunización (Abbas

*et al.*, 2012). Este sistema presenta muchas limitaciones: costos, tiempo, experiencia en manejo de líneas celulares, muchas moléculas no son inmunogénicas y algunas son tóxicas para los sistemas “*in vivo*” de inmunización (por ejemplo ratones) (Geyer *et al.*, 2012; Winter *et al.*, 1991); por lo que la tecnología de anticuerpos monoclonales evolucionó hacia la tecnología de anticuerpos recombinantes.

La tecnología de anticuerpos recombinantes engloba la manipulación y producción de los genes que codifican fragmentos de los anticuerpos (Geyer *et al.*, 2012). En la Figura 07, se muestra los diferentes fragmentos de los anticuerpos, entre los cuales se encuentra: el fragmento scFv que se basa en las regiones variables VH y VL unidas mediante una unión flexible; el fragmento Fab (fragmento de unión al antígeno) basado en los dominios variables, con el primer dominio constante de ambas cadenas unidas por un puente disulfuro y el fragmento sdAb (anticuerpo de dominio único) en base al dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo (Houen, 2015; Maynard *et al.*, 2000). Esta tecnología presenta muchas ventajas entre la que se destaca la factibilidad de producción de anticuerpos en sistemas biotecnológicos factibles como *E.coli* (Dubel *et al.*, 2010). En la Tabla 02, se menciona otras ventajas en comparación a la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales; como un mínimo tiempo de producción, capacidad de mejoramiento de afinidad y estabilidad por manipulación genética, uso terapéutico y reducida cantidad de antígeno para la selección (Dubel *et al.*, 2010).

A pesar de las múltiples ventajas de los anticuerpos recombinantes estos presentan algunos inconvenientes como es el caso del fragmento scFv, el cual presenta problemas de degradación proteolítica y agregación de acuerdo a la longitud del péptido que une

ambos dominios (Whitlow *et al.*, 1993). En el caso de la producción de los dominios aislados VH o VL, éstos son difíciles de manejar por su cara hidrofóbica (Vincke *et al.*, 2012).

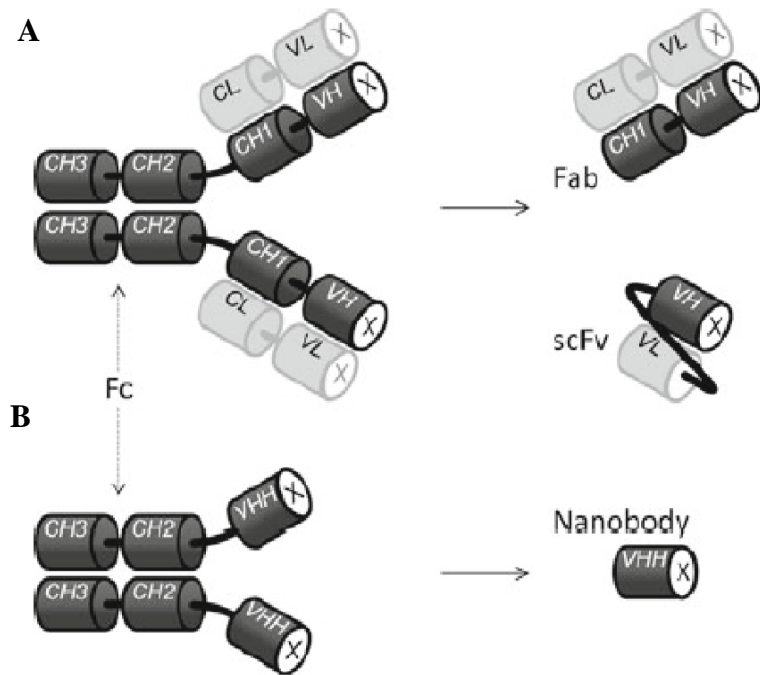
**Tabla 02.** Comparación de características generales entre las tecnologías de generación de anticuerpos.

| <b>Características</b>                                  | <b>Anticuerpos policlonales</b> | <b>Anticuerpos monoclonales</b> | <b>Anticuerpos recombinantes</b>                                  |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|
| <b>Cantidad de antígeno</b>                             | Para inmunizar (1-200 ug)       | Para inmunizar (30 ug)          | Para selección (depende ug)                                       |
| <b>Predeterminación de especificidad conformacional</b> | No es posible                   | No es posible                   | Factible mediante el ajuste en el sistema de selección            |
| <b>Capacidad de evitar la reacción cruzada</b>          | No es posible                   | No es posible                   | Factible mediante uso de un competidor en el sistema de selección |
| <b>Uso de un antígeno toxico</b>                        | Difícil                         | Difícil                         | Posible   |
| <b>Tiempo de selección</b>                              | Meses                           | Meses                           | Semanas   |
| <b>Afinidad</b>   | No definido                     | En el rango nM a uM             | En el rango nM a uM   |
| <b>Mejoramiento de la</b>                               | No es posible                   | Tedioso, sub                    | Fácil, mediante mutaciones  |



|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| <b>afinidad</b>                         |  | clonamiento en<br>hibridoma,<br>seguido de una<br>mutación |  |
| <b>Uso terapéutico</b>                  | No es posible en<br>enfermedades<br>crónicas         | Requiere<br>humanización                                   | Es posible   |
| <b>Estabilidad en la<br/>maduración</b> | No es posible  | Difícil  | Fácil, mediante mutación y<br>selección <i>in vitro</i> .  |
| <b>Sistema de<br/>producción</b>        | En sistemas de<br>ratón, conejo y<br>otros animales. | En sistemas de<br>cultivo de<br>células<br>mamíferas.      | En sistemas de <i>E.coli</i> ,<br>bacterias gram-positivas,<br>levaduras, hongo, células de<br>insectos, plantas, cultivos<br>de células mamíferas y<br>animales transgénicos. |
| <b>Cantidad de<br/>anticuerpo</b>       | Limitada   | No limitado  | No limitado  |
| <b>Almacenamiento del<br/>clon</b>      | No es factible                                       | En nitrógeno<br>líquido                                    | Congelado o en la<br>computadora.  |
| <b>Transporte del clon</b>              | No es factible                                       | En hielo seco  | A temperatura ambiente, en<br>forma de ADN.  |

Fuente: (Dubel *et al.*, 2010).



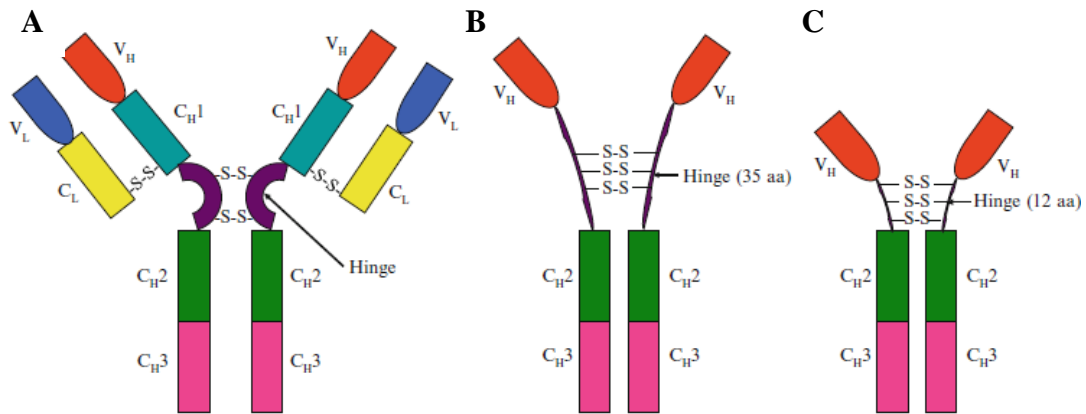
**Figura 07.** Representación esquemática de tipos de anticuerpos recombinantes. **(A)** Un anticuerpo IgG convencional y **(B)** un anticuerpo IgG de cadena pesada de camélido. El fragmento Fab es el fragmento de unión al antígeno, el scFv engloba los dominios variables de las dos cadenas unidos por un conector y el anticuerpo de dominio único. Las abreviaturas corresponden: VH (región variable de la cadena pesada), VL (región variable de la cadena ligera), CL (región constante de la cadena ligera) y CH1 (dominio constante 1 de la cadena pesada) (Imagen reproducida de Vincke *et al.*, 2012).

### 3.6.4 Anticuerpos de dominio único

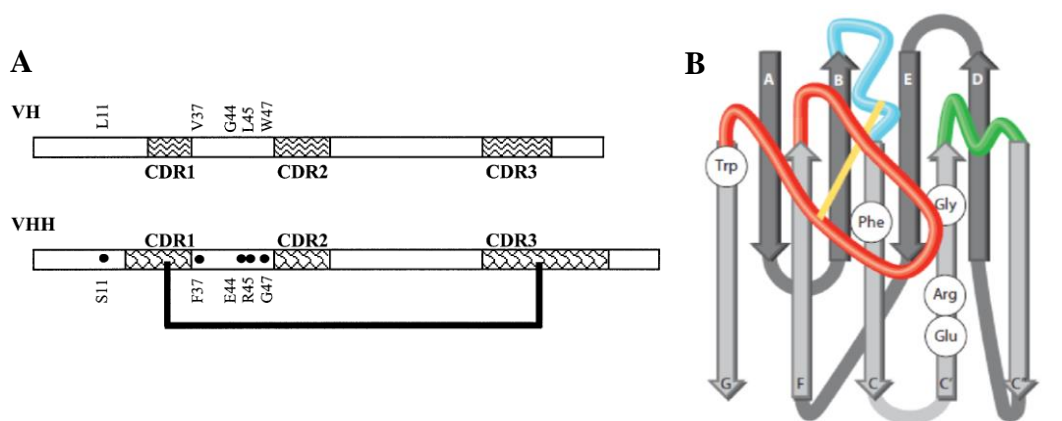
Los dominios de un anticuerpo, debido a la presencia de su cara hidrofóbica, necesitan diversas mutaciones que aumenten su solubilidad y así poder ser producidos de forma aislada (Tanha *et al.*, 2006), lo que implica procesos tediosos y complejos; por lo que se buscaron enfoques alternativos como los anticuerpos extraídos a partir de sueros de camélidos. Este tipo de anticuerpos funcionales sólo cuentan con las dos cadenas pesadas con su dominio variable y sus dos dominios constantes (Hamers-Casterman *et al.*, 1993).

Estos anticuerpos pertenecen a la familia de las IgG en camélidos de las clases IgG2 (con una larga bisagra) e IgG3 (con una bisagra pequeña), que no cuentan con el dominio CH1 de un anticuerpo típico (Figura 08). Mientras que la clase de los IgG1 presentan la forma típica de un anticuerpo (con una cadena ligera y pesada completa) (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). A partir de las clases de IgG2 y IgG3, se desarrollaron los sdAbs que están en base a un dominio variable de la cadena pesada, los cuales han demostrado mayores ventajas frente a los demás fragmentos, como un alto rendimiento de expresión en bacterias (Arbabi-ghahroudi *et al.*, 2005), son altamente solubles y estables, tienen alta afinidad y el reconocimiento de un único epítoto conformacional relacionado a su largo CDR3 (Muyldermans, 2001; Pain *et al.*, 2015). Dichos sdAbs llamados también como VHH (dominio variable de la cadena pesada de un camélido) o nanobodies cuentan con un diámetro de 4 nm por 2.5 nm de diámetro y un peso molecular de 15 KDa en promedio (Hoogenboom, 2005; Vincke *et al.*, 2012).

Entre sus características principales, los sdAbs tienen una alta estabilidad (Dumoulin *et al.*, 2002) y solubilidad; gracias a la sustitución de residuos hidrofóbicos por hidrofílicos en la región de marco conservado 2 (FR2) (Figura 9-A) (Muyldermans *et al.*, 1994; Vu *et al.*, 1997). Además, la región hipervariable CDR3 es más larga que el promedio (Figura 9-B), lo cual le permite una mayor superficie de interacción y por ende le permite reconocer epítopes que son usualmente no antígenos para los anticuerpos clásicos (Harmsen *et al.*, 2000; Muyldermans *et al.*, 1994; Vincke *et al.*, 2012). Ward *et al.* (1989), encontró, caracterizó y expresó en *E.coli* dos sdAbs contra lisozima con una afinidad en el rango nanomolar (20 nM), lo que demostró la utilidad de los sdAbs en el diagnóstico. A partir de este punto, gracias a la manipulación genética, se llegó a generar las bibliotecas de sdAbs y otros fragmentos de anticuerpos.



**Figura 08.** Tipos de anticuerpos de cadena pesada a partir del suero de camélidos. Existen tres tipos los cuales son: **(A)** El IgG1 que muestra la forma convencional con la cadena pesada y ligera, **(B)** El IgG2 es un anticuerpo de cadena pesada con una bisagra larga y, **(C)** El IgG3 es un anticuerpo de cadena pesada con una bisagra corta (Imagen reproducida de Houen, 2015).



**Figura 09.** Representación esquemática de un anticuerpo de dominio único VHH. **(A)** Diagrama lineal de las diferencias en la secuencia entre un VH y un VHH (Imagen reproducida de Muyldermans, 2001). **(B)** Diagrama esquemático de un anticuerpo de dominio único VHH (Imagen reproducida de Muyldermans, 2013).

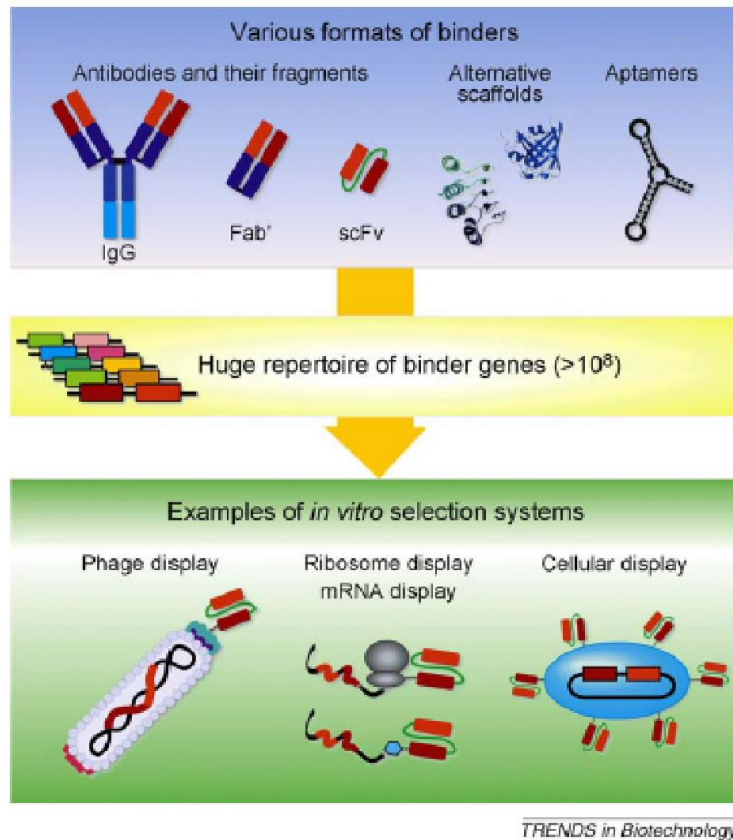
### 3.6.5 Bibliotecas de anticuerpos

Las bibliotecas de anticuerpos se generaron con el objetivo de buscar ligandos (anticuerpos) con la facultad de unirse a un antígeno de manera específica a partir de una diversidad de anticuerpos. Existen dos tipos principales de bibliotecas dependiendo de la fuente de obtención, que son: (i) las bibliotecas naturales (a partir del bazo de animales inmunizados o las células plasmáticas de donadores humanos) y (ii) las sintéticas (a partir de la ingeniería genética) (Hoogenboom, 2002). Las bibliotecas naturales pueden ser inmunizadas y no inmunizadas (llamadas también “*naive*”), cuyas limitaciones son la tolerancia inmunológica, el sesgo inmunológico y las limitaciones éticas (en el caso de las inmunizadas); además de la falta de información de la diversidad de las librerías “*naive*” que puede afectar la especificidad y afinidad (Zhao *et al.*, 2016). Las limitaciones mencionadas son superadas por las bibliotecas sintéticas, desarrolladas por la reconstrucción “*in vitro*” de los genes de los dominios variables por aleatorizaciones de las regiones hipervariables, (Nissim *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2016), que permiten seleccionar anticuerpos contra antígenos no-inmunogénicos, tóxicos y antígenos propios (Chan *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2005; Pansri *et al.*, 2009). Las bibliotecas sintéticas se dividen en las sintéticas y las semi-sintéticas; cuya diferencia radica en el origen de regiones CDR. En el caso de las bibliotecas semisintéticas, la región CDR proviene de una línea germinal o de donadores y en el caso de las bibliotecas sintéticas son desarrolladas “*in silico*” (Hoogenboom, 2005). En el caso de ambas bibliotecas se les realizan aleatorizaciones en la región hipervariable del VH para poder generar una biblioteca con una alta diversidad de anticuerpos recombinantes (Zhao *et al.*, 2016).

### **3.7 Tecnología *Phage Display* y bibliotecas de fagos-anticuerpos**

Con el desarrollo de las bibliotecas de anticuerpos, se procedió al desarrollo de tecnologías que permitan la selección de clones que sean específicos contra un blanco o antígeno en particular. En consecuencia, se desarrollaron las tecnologías *Display* (Figura 10), las cuales se basan en la expresión de péptidos/proteínas en un vector particular, como son: (i) la tecnología *Phage Display* (usa un fago), (ii) la tecnología *Ribosoma Display* (utiliza un ribosoma) y (iii) la tecnología *Yeast Display* (usa una levadura) (Bahara *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Geyer *et al.*, 2012).

La tecnología más utilizada por sus ventajas biotecnológicas, es la tecnología *Phage Display* (PD); debido a que necesitan un mínimo requerimiento de equipos de laboratorio, no necesitan un trabajo laborioso y presentan una amplia versatilidad en la selección (Chan *et al.*, 2014). En la Tabla 03, se muestra las ventajas y desventajas de las tecnologías *Display*.



**Figura 10.** Formatos de tecnología Display en la expresión de anticuerpos recombinantes. En la parte superior se observa los anticuerpos recombinantes que dan lugar a un repertorio de genes de los anticuerpos recombinantes, que luego son clonados en los sistemas Display, generando la expresión de los anticuerpos en la parte superficial de cada sistema (Imagen reproducida de Dubel *et al.*, 2010).



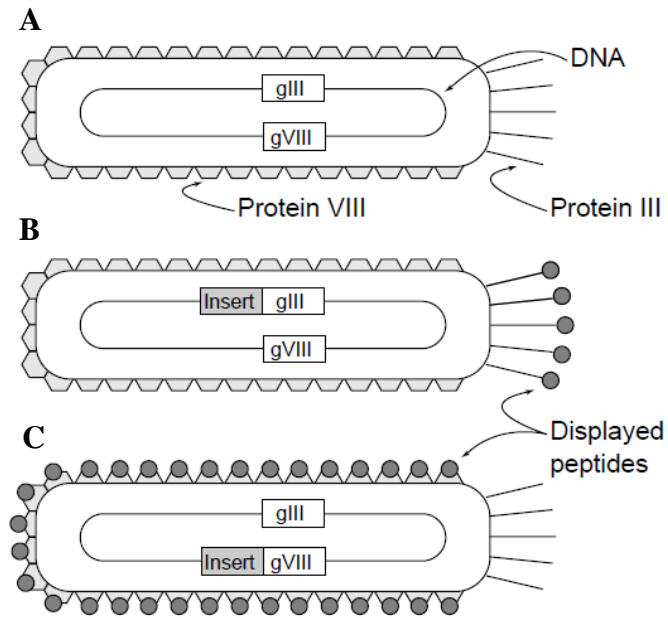
**Tabla 03.** Comparación de las tecnologías *Display*: tecnología *Phage Display*, tecnología *Ribosoma Display*, tecnología *Yeast Display* y tecnología de células B para la selección de péptidos/proteínas y anticuerpos.

| <b>Tecnología Display</b> | <b>Tecnología <i>Phage Display</i></b>  | <b>Tecnología <i>Ribosoma Display</i></b>   | <b>Tecnología <i>Yeast Display</i></b>   | <b>Selección por células B</b>   |
|---------------------------|---|---|--|--|
| <b>Fuente</b>             | Inmune o no-inmune/sintética  | Inmune  |  |  |
| <b>Tamaño</b>             | Hasta 10 <sup>11</sup>  | Hasta 10 <sup>14</sup>  | Hasta 10 <sup>9</sup>  | Hasta 10 <sup>6</sup>  |
| <b>Formato</b>            | scFv/Fab/sdAb   | scFv  | Fab o IgG  | IgG  |
| <b>Ventajas</b>           | -Tecnología robusta.<br>-Requerimiento mínimo de instrumentación<br>-Condiciones de selección astringentes como extremos de pH y temperatura. | -Sistema de expresión en ribosomas con librerías con un largo tamaño.<br>-Conveniente para mutagénesis. | -Sistema de expresión eucariótico.<br>-Permite modificaciones post-traduccionales. | -Aislamiento de genes del dominio VH-VL de anticuerpos que han pasado por un proceso de maduración por afinidad. |

|                               |  |   |   |   |
|-------------------------------|--|---|---|---|
| <b>Desventajas</b>            | -Carece de modificaciones post-traduccionales. | -Requiere optimización por la inestabilidad del complejo.<br>-Necesidad de laboratorio especializado. | -El tamaño de la biblioteca es menor al de <i>ribosoma display</i> y <i>phage display</i> . | -Necesidad de un trabajo intensivo y laborioso.<br>-Biblioteca con un tamaño pequeño. |
| <b>Afinidad de Maduración</b> | Puede ser realizada “ <i>in vitro</i> ”.       | Puede ser utilizad para la selección de ligandos con alta unión.                                      | Puede ser utilizad para la selección de ligandos con alta unión.                            | No es necesario.  |

Fuente: (Chan *et al.*, 2014).

La tecnología PD inició con la investigación de George Smith en 1980, el cual fue el primero en expresar un segmento foráneo de una proteína en la superficie del bacteriófago M13 (Smith, 1985). Dicha tecnología se basa en el uso de un bacteriófago filamentosos no lítico (fd y M13) como un vector de expresión de un péptido, proteína y/o anticuerpo (Hoogenboom, 2002; Zhao *et al.*, 2016). La tecnología PD combinado con la tecnología de biblioteca de anticuerpos da lugar a las bibliotecas de fagos-anticuerpos. Las bibliotecas se generan cuando el ADN de los fragmentos de anticuerpos son clonados en el genoma del fago junto a los genes que codifican las proteínas de cubierta (PIII, PVI, PVIII), generando así la expresión de los mencionados en la cubierta del fago ensamblado (Figura 11) dentro de la bacteria de *E.coli* y después liberado (Hoogenboom, 2002). Luego los clones de la biblioteca son puestos en contacto con el antígeno y así los clones específicos son aislados por una selección por afinidad. (Hoogenboom, 2002).

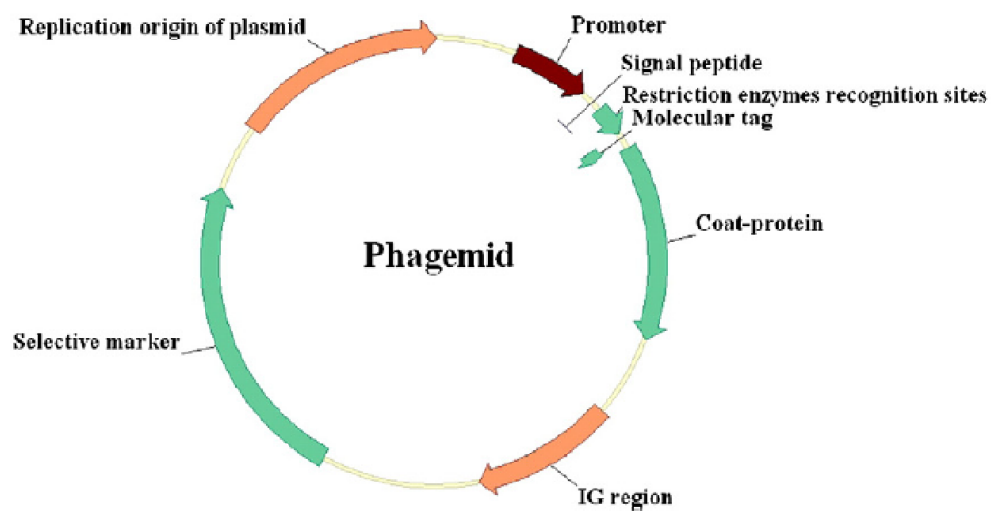


**Figura 11.** Representación esquemática del fago vector de la tecnología *Phage Display*. **(A)** Fago silvestre sin alteración, **(B)** Fago con el inserto fusionado junto al gen III generando la expresión del inserto junto a la proteína PIII en la superficie del fago y **(C)** Fago con el inserto fusionado junto al gen VIII que expresa el inserto en la superficie total del fago junto a la proteína PVIII (Imagen reproducida de (Kay *et al.*, 1998).

### 3.7.1 Fagémidos

Los fagos de la tecnología PD han avanzado mediante la manipulación genética para dar lugar a vectores llamados fagémidos. Los fagémidos son vectores derivados de los fagos filamentosos y se diferencian de los fagos por contar con un origen de replicación de un plásmido. Además están compuestos sólo por un gen de proteína de cubierta del fago, el fragmento de ADN del péptido señal, el marcador de selección, una región intergénica con el origen de replicación del fago, un promotor y el anticuerpo u proteína/péptido de interés fusionado al gen de cubierta del fago (Figura 12) (Qi *et al.*, 2012).

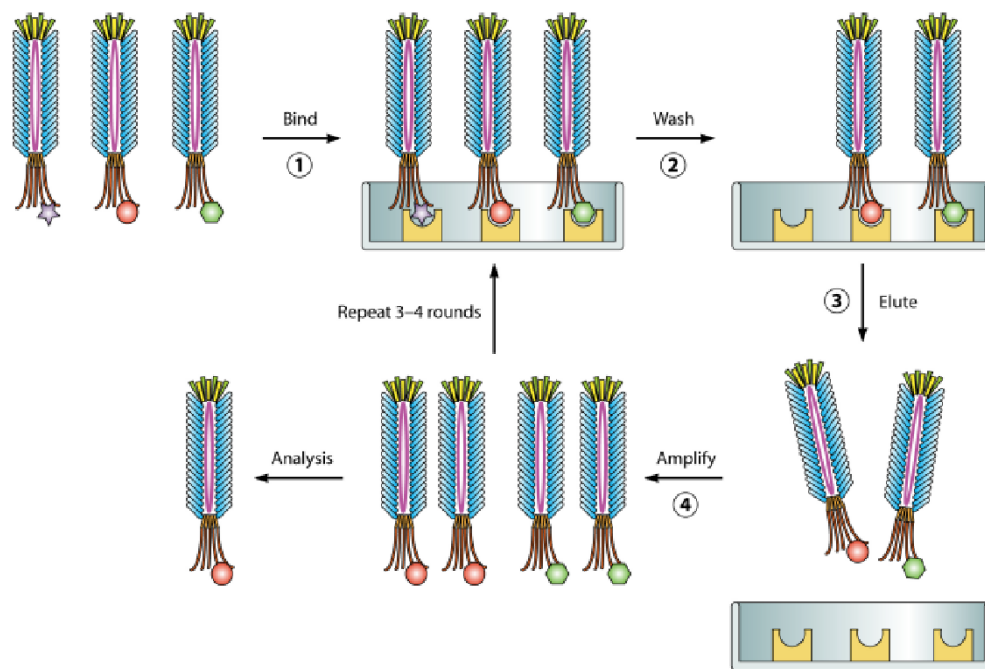
El ciclo de vida del fagémido inicia con la infección de la célula de *E. coli* donde el ADN de una sola cadena del fagémido genera formas replicativas gracias al origen de replicación del fago (Qi *et al.*, 2012). Las formas replicativas de doble hebra se replican como un plásmido gracias a su origen de replicación, lo que permite su manipulación genética para otros ensayos. Ya que el fagémido carece de los genes que expresan todas las proteínas de cubierta, es incapaz de ensamblar nuevas partículas de fagos por sí mismo por lo que necesita la superinfección de un fago cooperador (Howe, 2007; Zhao *et al.*, 2016). En el proceso de superinfección, el genoma del fago cooperador ingresa a la célula de *E. coli* y usando el sistema de transcripción y traducción de la célula, genera las proteínas de cubierta. Estas proteínas se van ensamblando en la membrana de la *E. coli* permitiendo la liberación de fagos donde cada uno contiene el fagémido con el anticuerpo de interés (Howe, 2007; Zhao *et al.*, 2016).



**Figura 12.** Diagrama esquemático de los componentes de un fagémido (Imagen reproducida de Qi *et al.*, 2012).

### **3.7.2 Bio-cribado o selección en la tecnología de fago-anticuerpo**

La tecnología PD permite la identificación de clones con una capacidad de unión específica por un blanco en particular mediante el proceso denominado bio-cribado (en inglés *biopanning*) o selección (Bahara *et al.*, 2013). El bio-cribado (Figura 13) se basa en la selección de clones por medio de la unión cinética de los clones de la biblioteca de fagos contra un blanco en particular, el lavado de los clones no unidos y la elución de los clones específicos (Hoogenboom, 2002; Pande *et al.*, 2010). Existen diversos formatos de selección como por ejemplo: en columnas, en sensores, en una superficie sólida (el método más usado) donde se inmovilizan proteínas, péptidos o antígenos; así como antígenos biotinilados, en células de procariontas o líneas celulares fijadas, en secciones de tejidos y células enteras (Hoogenboom, 2002, 2005). Típicamente después de una o dos rondas de selección con un antígeno puro, las bibliotecas están suficientemente enriquecidas en la identificación de fragmentos de anticuerpos específicos.



**Figura 13.** Proceso de Bio-cribado en la tecnología *Phage Display*. El proceso incluye los pasos de unión de la biblioteca al antígeno, lavado de todos los fagos no específicos, elución de los fagos afines y amplificación de los fagos para el análisis (Imagen reproducida de Huang *et al.*, 2012).



### 3.8 Biblioteca sintética de sdAb denominada PREDATOR

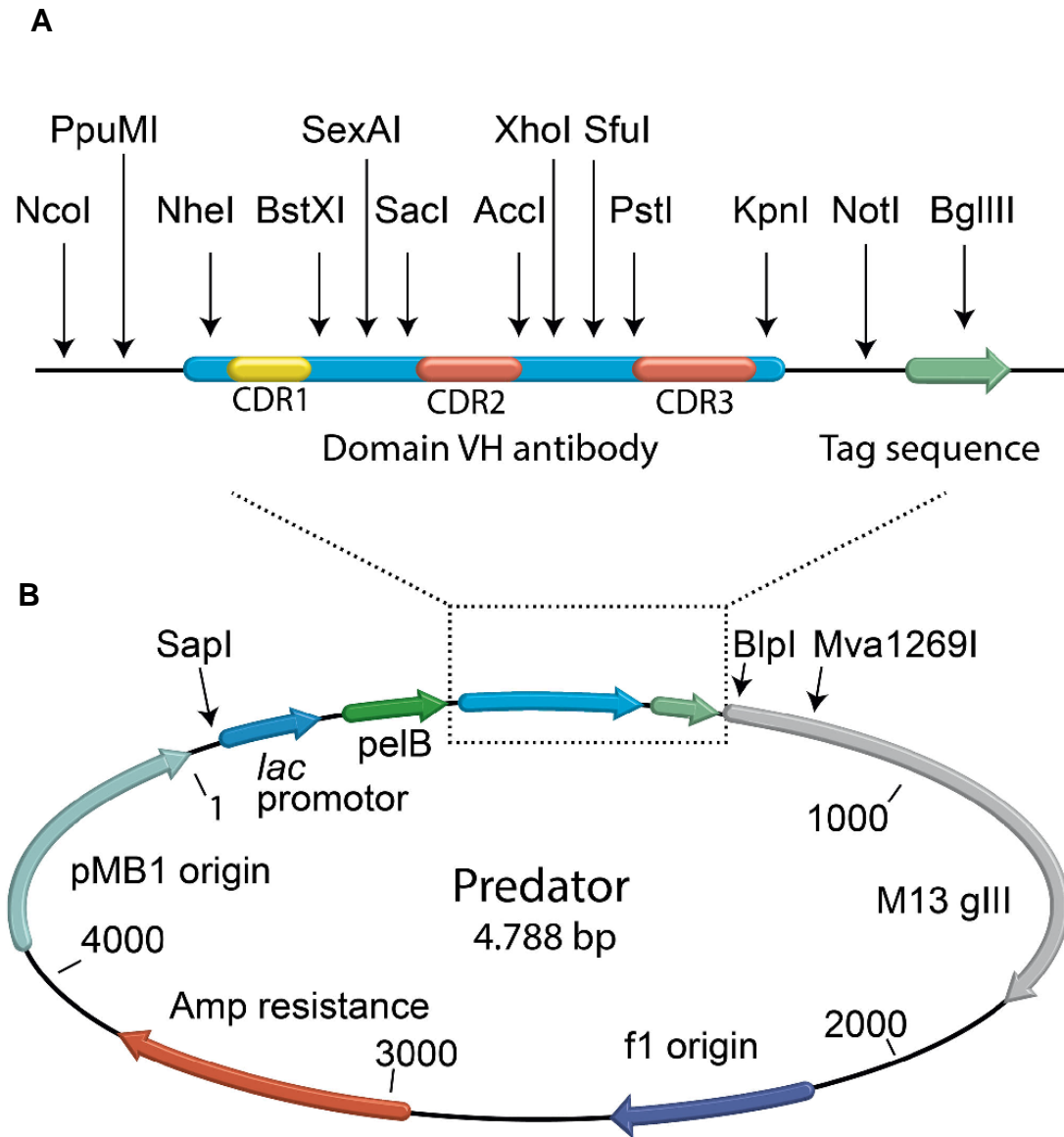
PREDATOR es una biblioteca sintética de sdAb que fue desarrollada por Mandrup *et al.*, (2013), en base al fagémido pHEN1 cuyo inserto estuvo constituido por secuencias que codifican sdAbs construidas en base al sdAB HEL4 de origen humano.

El vector PREDATOR cuenta con las siguientes características: gen de resistencia a la ampicilina, el origen de replicación del fago “f1”, el gen que expresa la proteína PIII, el origen de replicación bacteriano pMB1, la secuencia del péptido señal pelB y el gen del sdAb insertado (Figura 14-B). El sdAb fue sintetizado a partir del sdAb HEL4 con mutaciones silenciosas entre las regiones CDR para generar los sitios de restricción de acuerdo a la Figura 14-A.

La diversidad de la biblioteca PREDATOR, es el resultado de la adición aleatoria de trinúcleotidos en las regiones hipervariables CDR2 y CDR3 en cadenas de ADN de una sola hebra del sdAb Hel4, las mismas que fueron amplificadas mediante un proceso de PCR libre de alineamiento (*PCR free annealing*) dando lugar a la diversidad de las secuencias. Estos genes sdAbs se clonaron en los fagémidos de la biblioteca PREDATOR y fueron utilizados para transformar las células de *E.coli*; obteniendo una diversidad de  $6.2 \times 10^7$  clones únicos funcionales (Mandrup *et al.*, 2013).

La secuencia de aminoácidos del sdAb HEL4 utilizado en el diseño de la biblioteca fue descrito por Jaspers *et al.* (2004), quien seleccionó 21 sdAbs a partir de una biblioteca de fagos-sdAbs (basada en el segmento 3-23 del gen DP47 (dominio VH3 humano)); por su afinidad a la lisozima de huevo de gallina (*Hen Egg Lysozyme* (HEL)). A partir selección, se identificó al sdAb HEL4, que demostró tener propiedades similares a los

sdAbs aislados de camélidos, como son: la alta solubilidad, resistencia a la agregación, estado monomérico y un desplegamiento térmico reversible (Jespers *et al.*, 2004). A diferencia de otros sdAbs de camélidos, el sdAb HEL4 no muestra variación en los residuos presentes en las regiones hidrofóbicas del FR y, presenta un cambio en la región CDR1 (Trp 47/Gly35) lo que favorece su solubilidad.



**Figura 14.** Mapa del vector de la biblioteca PREDATOR. **(A)** Región del anticuerpo con el diseño de los sitios de restricción y las regiones CDR2 y CDR3 donde se realizaron las aleatorizaciones. **(B)** El mapa del vector fagémido enmarcando los componentes más importantes (Imagen reproducida de Mandrup *et al.*, 2013).

### 3.9 Aplicaciones en el diagnóstico de la tecnología *Phage Display*

La tecnología PD es una tecnología con bastantes ventajas, ya que su habilidad de interacción péptido-péptido/proteína o anticuerpo-antígeno permite identificar ligandos con múltiples usos en diferentes campos de estudio. Entre sus ventajas, se cuenta con la identificación de ligandos contra blancos difíciles de manejar como son las proteínas no-inmunogénicas, toxinas, lípidos, proteínas de membrana, membranas de complejos celulares y proteínas con modificaciones post-traduccionales (Chan *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Pansri *et al.*, 2009). Las bibliotecas de la tecnología PD como es el caso de la biblioteca de fago-anticuerpo, permiten identificar anticuerpos como ligandos con fines terapéuticos, en estudios de proteómica, en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y cáncer, en el desarrollo de vacunas como vehículos específicos, en la neutralización terapéutica, en la detección de virus y en el estudio de procesos intracelulares (Pande *et al.*, 2010). Hasta el momento, son múltiples los organismos estudiados por la tecnología PD en los diferentes campos de la investigación, como es el caso de *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepática*, *Taenia solium*, *Schistosoma japonicum*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* (Castel *et al.*, 2011; Ellis *et al.*, 2012; Geyer *et al.*, 2012; Pansri *et al.*, 2009; Paschke, 2006; Tonelli *et al.*, 2013).

A nivel de *Leishmania*, la tecnología PD ha sido utilizada con fines de inmunodiagnóstico en la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante el uso de bibliotecas sintéticas de péptidos para el caso de LV en caninos (Costa *et al.*, 2014; Toledo-machado *et al.*, 2015); y en la búsqueda de péptidos como posibles candidatos para vacunas de LV en humanos (Costa *et al.*, 2014; Naiyer *et al.*, 2013).

#### IV. Justificación

La población en riesgo de infección de leishmaniasis se encuentra mayormente en las zonas rurales donde sólo tienen acceso a los CAP. En estos laboratorios sólo se cuenta con el método de diagnóstico directo por tinción giemsa de frotis que es poco eficaz por su baja sensibilidad y problemas técnicos en su manejo. Estas limitaciones del diagnóstico perjudican a la población en riesgo evitando el acceso a un diagnóstico temprano ya que en muchos casos tienen que transportarse por largos tramos para llegar a los CAP.

Por lo que se propone, la búsqueda y selección de nuevas herramientas biotecnológicas eficaces que permitan la detección rápida de los parásitos de *Leishmania* como los sdAbs. Ya que previos estudios han demostrado la eficacia de estos sdAbs en la terapia y el diagnóstico de otras enfermedades como el cáncer (Audenhove *et al.*, 2016) por sus ventajas de resistencia a la agregación, alta solubilidad y su factibilidad de producción en los sistemas bacterianos como *E. coli*.

En el presente trabajo de investigación se seleccionaron sdAb a partir de una biblioteca sintética PREDATOR mediante la tecnología PD, que es una tecnología más robusta, estable y con facilidades biotecnológicas (Bahara *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Geyer *et al.*, 2012) contra el estadio amastigote de *Leishmania*. Permitiendo así la obtención de sdAbs candidatos que sean afines al estadio infectivo (amastigote) y a futuro sean utilizados como potenciales herramientas para la optimización del diagnóstico microscópico de leishmaniasis.

## **V. Hipótesis**

La biblioteca sintética aleatoria de anticuerpos de dominio único (sdAb) de origen humano no inmunizado, llamada “PREDATOR”, contiene clonas de fagos-sdAbs específicos para el estadio amastigote del género *Leishmania*.

## **VI. Objetivos**

### **Objetivo general**

Identificar mediante la tecnología PD aquellos sdAbs presentes en una biblioteca sintética PREDATOR que muestren alta afinidad por el estadio amastigote de parásitos del género *Leishmania*.

### **Objetivos específicos**

- 6.1 Obtención de promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes obtenidas de orejas de ratón infectadas con parásitos *Leishmania*.
- 6.2 A partir la biblioteca sintética PREDATOR, seleccionar por bio-cribado y detección por ELISA aquellos fagos-sdAb candidatos que se unan a amastigotes axénicos.
- 6.3 Clonar los fragmentos sdAbs de los fagos-sdAbs candidatos en el plásmido vector pET22b(+); producir los sdAbs como proteína soluble; y evaluar la capacidad de unión específica de los sdAbs contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis*.
- 6.4 Evaluar la capacidad de detección de amastigotes de oreja de ratón infectado del o los sdAbs candidatos.

## VII. Metodología

### 7.1 Muestras biológicas

#### 7.1.1 Cepas de *Leishmania*

Las especies de *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2904 (MHOM/BR/75/M2904), *Leishmania (V.) guyanensis* cepa M4147 (MHOM/BR/75/M4147), *L (L.) amazonensis* cepa LV79 (MHOM/BR/72/M1841) y *Leishmania (V.) peruviana* cepa LCA08 (MHOM/PE/90/LCA08) fueron obtenidas a partir de promastigotes criopreservados en nitrógeno líquido. Todas las especies fueron aisladas de pacientes en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y fueron caracterizadas mediante un ensayo de PCR y polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción a partir del gen hsp70 según el procedimiento descrito por Montalvo *et al.* (2011), en la Unidad de Epidemiología molecular – UPCH para confirmar la especie.

#### 7.1.2 Cepa de *Trypanozoma cruzi* y células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

En el presente trabajo de investigación se utilizó otros complejos celulares para los ensayos; como son los epimastigotes de *T. cruzi* que fueron donados por parte de la PhD Manuela Verástegui del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas-UPCH. Los PBMCs fueron extraídos según el protocolo de Strober *et al.* (1996), en el Laboratorio de Pathoantígenos- UPCH y donados al proyecto para su uso.

#### 7.1.3 Modelo murino

El modelo murino seleccionado para el proyecto de investigación fue el ratón albino

BALB/c, para lo cual se adquirió 20 ratones machos de 6 – 8 semanas del bioterio de la UPCH. El manejo y cuidado de los ratones se basó en la guía propuesta por el Ministerio de Salud-Instituto Nacional de salud (Fuentes Paredes *et al.*, 2008), por lo que los ratones se mantuvieron en un área especializada del bioterio con jaulas ventiladas bajo condiciones libres de patógenos con acceso libre de agua y una alimentación balanceada.

Además, el proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de la UPCH (Anexo 3).

#### **7.1.4 Biblioteca PREDATOR**

La biblioteca PREDATOR desarrollada por Mandrup *et al.* (2013), fue donada por el Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus-Dinamarca. La misma que fue desarrollada de forma sintética

Los clones de la biblioteca, fueron transportados en su forma de fagos, en hielo seco y mantenidos a una temperatura de -80°C.

El fago KM13 fue descrito y desarrollado por Kristensen *et al.* (1998), el que se caracterizó por contar con un sitio de reconocimiento de tripsina entre el dominio D2 y D3 de la proteína PIII del fago. Del mismo modo que la biblioteca PREDATOR, el fago KM13 fue proporcionado por el Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus-Dinamarca.

#### **7.2 Reactivos y materiales**

- Ampicilina (SIGMA - A0166)
- Agar (SIGMA – A7002)



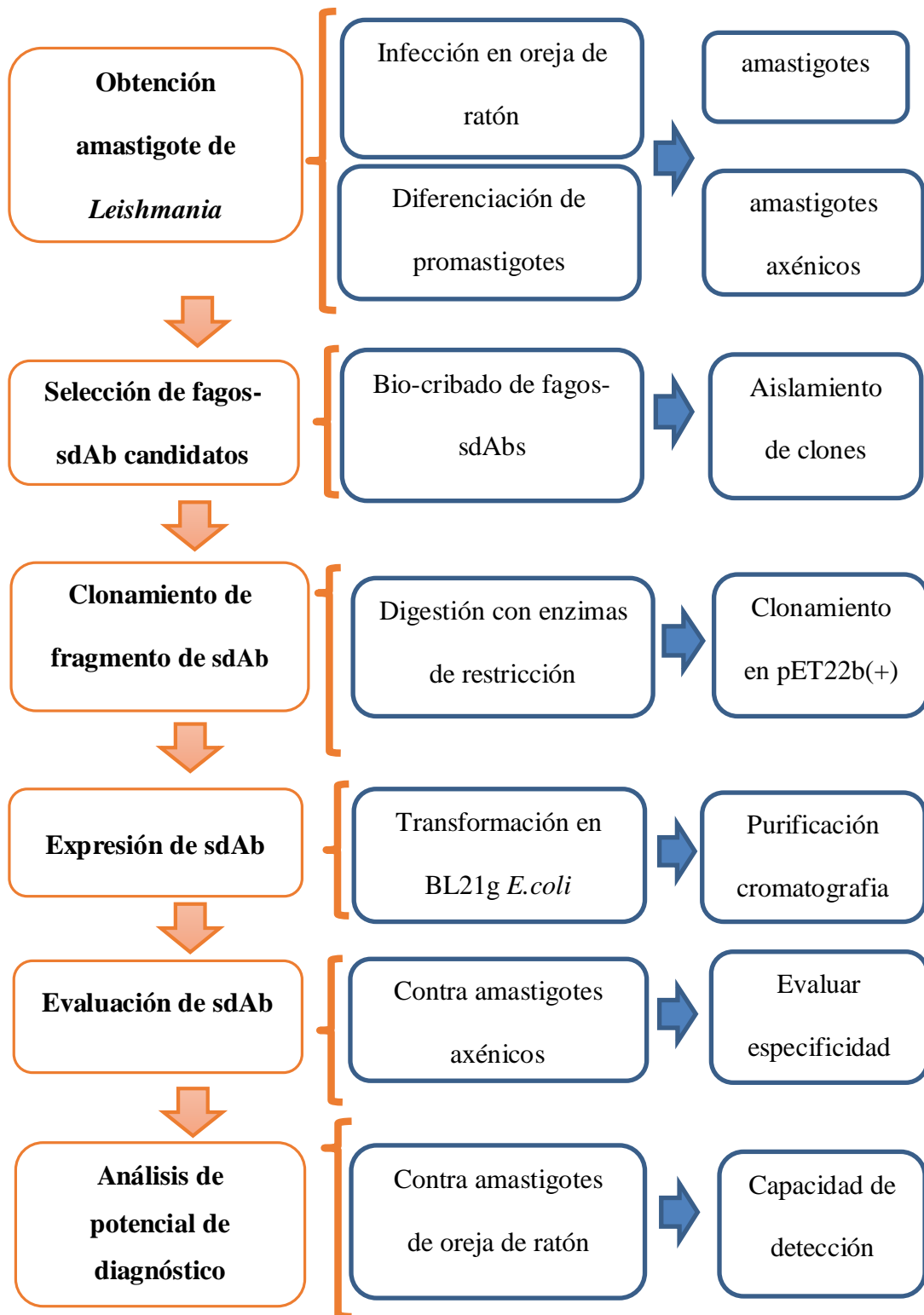
- Agar sangre base (MERCK - 110886)
- Albúmina de suero bovino (SIGMA ALDRICH – A3912)
- Anti-IgG ratón-HRP (SIGMA-ALDRICH - A2304)
- Anti-M13/HRP (QIAGEN – 27942101)
- Cepa *Escherichia coli* XL1- blue
- Cepa *E. coli* BL21-gold
- Cepa *E. coli* TG1
- c-Myc Antibody (9E10) (Thermo Fisher Scientific - MA1- 980)
- Cloruro de sodio (SIGMA ALDRICH – S5886)
- Dimetilsulfóxido ( SIGMA – D5879)
- Extracto de levadura (Merck Millipore – 1037530500)
- Fijador para autoradiografía Kodak (SIGMA ALDRICH – P7167)
- Glicina (SIGMA – G8898)
- Isopropanol (Merck Millipore – 1096341000)
- Kanamicina (SIGMA - 60615)
- Kit de extracción de plásmidos GeneJET (Thermo Fisher Scientific – k0502)
- Kit de purificación por proteína A HP (GE Healthcare – 28-9031-32)
- Kit de recuperación ADN en gel Zymoclean™ (Thermo Fisher Scientific – D4007)
- Medio M199 (SIGMA ALDRICH – M0393)
- Placas de 96 pozos con fondo plano no estériles maxisorp (Thermo Scientific– 442404)
- Placas para electroforesis (BIORAD)

- Película de exposición (13x18 cm) (Thermo Scientific – 34090)
- Penta-His HRP Conjugado (QIAGEN- 1014992)
- Penicilina/Estreptomicina (SIGMA - P4333)
- L-glutamina (SIGMA – G3126)
- Proteína A, Alexa Fluor®488 (Thermo Fisher Scientific – P11047)
- Sistema de detección Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific – 32209)
- Sulfato de amonio (SIGMA ALDRICH – A4418)
- Tamiz celular estéril de 40 µm (BD Falcon – 352340)
- Tetrametilbenzidine (TMB) (KPL – 520003)
- Tris Base (SIGMA – 10708976001)
- Triton X-100 (SERVA – 37240)
- Triptona (SIGMA – T9410)
- Tween (SIGMA)
- Tampón fosfato salino (PBS) (Chem cruz – SC 24947)
- Revelador para auto radiografía Kodak (SIGMA ALDRICH – P7042)

### **7.3 Diseño del estudio**

El presente trabajo de investigación tuvo un alcance exploratorio y descriptivo con un enfoque cuantitativo en el análisis de los resultados.

#### 7.4 Flujograma del estudio



## **7.5 Procedimientos**

### **7.5.1 Obtención de parásitos**

Para la obtención de parásitos se utilizaron dos metodologías: (a) La producción “*in vitro*” de promastigotes y amastigotes axénicos; (b) La extracción “*in vivo*” de amastigotes a partir de la infección en oreja de ratón BALB/c.

#### **7.5.1.1 Método “*in vitro*” para la obtención de promastigotes**

Los promastigotes fueron descriptopreservados según el protocolo de Sacks *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Brevemente, los crioviales con las cepas fueron retiradas del nitrógeno líquido e inmediatamente fueron puestos en el baño maría a 37°C hasta que se descongelaron. Luego, se limpiaron los crioviales con etanol al 70% y la suspensión de los parásitos fue transferida a un tubo con 0.5ml de medio bifásico a pH 7.4 (agar sangre base con 20% de sangre desfribinada de conejo, medio M199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomycin y 1% glutamina). Los cultivos se incubaron a 26°C por 4 días y se repicaron por pasajes sucesivos en 0.5mL de nuevo medio bifásico a pH 7.4 cada 3-4 días.

#### **7.5.1.2 Método “*in vitro*” para la obtención de amastigotes axénicos**

La obtención de amastigotes axénicos necesita el estímulo de dos factores ambientales que son la elevación de la temperatura y el descenso del pH, estos cambios permiten la diferenciación de promastigotes a amastigotes (Bates, 1993; Gupta *et al.*, 2001; Zilberstein *et al.*, 1994). El protocolo utilizado para la obtención de amastigotes axénicos fue el reportado por Teixeira (2002). Brevemente, los promastigotes de *L (V.)*

*braziliensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis* fueron mantenidos en 1mL de medio bifásico a pH 7.4; a partir de este se pasaron a 0.5mL del cultivo en 2 frascos con 5mL de medio bifásico y fueron puestos a incubar a 26°C. Al tercer día de crecimiento, los parásitos fueron centrifugados, resuspendidos en 50mL de medio monofásico a pH 7.4 (M199 con 20% de SFB, 100U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomicina y 1% glutamina) e incubados por 4 días a 26°C. Para la diferenciación de promastigote-amastigote axénico, los promastigotes del cultivo fueron centrifugados a una velocidad de 1500xg por 10 min a 4°C y el pellet fue resuspendido en 50mL de medio monofásico a un pH de 5.5 a una concentración de  $5 \times 10^6$  parásitos/mL. Al 4 día de incubación a 34°C, los parásitos fueron centrifugados a 2300xg durante 10 minutos a 4°C y el pellet obtenido fue resuspendido en PBS a un pH de 7.4 (este paso fue repetido dos veces) y en el paso final el pellet con los amastigotes axénicos diferenciados fueron resuspendidos en 450µL de percoll al 45%.

Con la finalidad de separar los amastigotes no viables y promastigotes, se realizó un proceso de purificación con una gradiente de percoll diluido en PBS, basada en tres fases que son: percoll al 70%, 45% y 25%. La gradiente se armó con 150µL de percoll al 70%, 600µL del percoll al 45% mezclado con los amastigotes, y 450 µL de percoll al 25%. La gradiente fue centrifugada a 2300xg durante 60 minutos a 4°C. El halo que se encontraba entre las fases de 70% y 45% fue recuperado y puesto en PBS a pH 7.4. La suspensión de los parásitos fue centrifugada a 2300xg por 10 minutos a 4°C y el pellet con los amastigotes axénicos fue resuspendido en PBS (este paso se repitió dos veces).

A continuación, los amastigotes fueron criopreservados de acuerdo a lo reportado por Sacks *et al.* (2015). Brevemente, el pellet con los amastigotes axénicos fue resuspendido en medio RPMI a una concentración de  $5 \times 10^7$  amastigotes/mL y mezclado con medio de criopreservación (medio RPMI con SFB al 10% y DMSO 7.5%) en una proporción 1:1 y luego, colocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  donde fueron almacenados hasta su uso.

### **7.5.1.3 Método “*in vivo*” para la obtención de amastigotes de oreja de ratón**

Además de la obtención de los amastigotes axénicos, se procedió con el aislamiento de amastigotes a partir de la infección en oreja de ratón de la cepa BALB/c, debido a que los amastigotes de este proceso se asemejan más a la realidad de las lesiones de pacientes con LC. El modelo experimental seleccionado fue el de ratón BALB/c, que es ampliamente utilizado por su característica de inmunodeficiencia en su respuesta de células-T así como su susceptibilidad frente a la infección por parásitos de *Leishmania* con diversos comportamientos en la lesión de acuerdo a la especie (Kumar, 2013).

Los cultivos con los promastigotes de las especies de *L. (L.) amazonensis* LV79, *L. (V.) guyanensis* M4147 y *L. (V.) braziliensis* M2904 fueron pasados a frascos con 5mL de medio bifásico pH 7,4 y se incubaron a  $26^{\circ}\text{C}$  por 4 días. Seguidamente, los cultivos fueron centrifugados a  $2300 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el pellet de promastigotes fue resuspendido en PBS a una concentración de  $10^8$  parásitos/mL para la infección en las orejas de los ratones BALB/c.

Para el proceso de infección, los ratones se anestesiaron con ketamina (tasa de dosis de 50-100 mg/kg) y xilacina (tasa de dosis de 1-5 mg/kg). Posteriormente, un volumen de

10  $\mu$ L de los promastigotes resuspendidos fue inoculado intradérmicamente en la oreja izquierda y se tomó la oreja derecha como control en un total de 5 ratones por grupo.

El avance de la lesión fue monitoreada semanalmente usando un caliper electrónico, hasta observar una diferencia significativa en el grosor entre la oreja izquierda (infectada) y la oreja derecha (control) ( $p \leq 0.05$ ). Los ratones del grupo que mostraron diferencia en el grosor de la oreja, fueron sometidos a eutanasia por inhalación de  $\text{CO}_2$  y se les extrajo los amastigotes. Estos amastigotes fueron utilizados para realizar infecciones en ambas orejas de 7 nuevos ratones por grupo. Después de 8-12 semanas de infección los ratones fueron sometidos a eutanasia debido a que previos estudios demuestran que ratones BALB/c infectados con *L. (L.) amazonensis*, a partir de la semana 8 presentan un infiltrado inflamatorio y monomórfico con una predominancia de macrófagos infectados con amastigotes con una escasa o ausencia de linfocitos (Almeida *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2012; Francesquini *et al.*, 2014).

La extracción de amastigotes se realizó en base a lo reportado por Kloehn (2015), donde las lesiones granulomatosas fueron seccionadas y lavadas con alcohol yodado, etanol al 70% y PBS frío. Los tejidos aislados se homogenizaron y fraccionaron para pasar luego por una separación celular mediante un tamiz celular estéril de nylon con poros de 40 $\mu$ m. Una parte se utilizó en la infección de ambas orejas en nuevos grupos de ratones BALB/c para la obtención de un número mayor de amastigotes para el ensayo. Y la otra parte fue lisada mediante unos pases por una jeringa con aguja de grosor de 27G (5 veces) y el remanente del debris celular del hospedero fue separado mediante una centrifugación diferencial de 60xg durante 10 minutos a 4 °C. El

sobrenadante obtenido fue centrifugado a 2300xg por 15 minutos a 4°C y el pellet de amastigotes se lavó dos veces con PBS frío. Los amastigotes se criopreservaron con el mismo procedimiento mencionado en la sección 7.5.1.2 y se cuantificaron mediante un conteo en cámara de Neubauer por microscopia de fluorescencia mediante coloración con naranja de acridina e yoduro de propidio.

#### **7.5.1.4 Preparación del antígeno de superficie**

En el proyecto de investigación se determinó como blanco de estudio a los antígenos de superficie de los amastigotes obtenidos. Por lo que se trabajó con las células enteras de los amastigotes ya que mantienen los antígenos de superficie en su forma nativa al mantener la forma de la membrana, y no son alterados por los procesos de purificación.

Para tal propósito los amastigotes criopreservados a -70°C fueron transferidos a un baño maría a 37°C para que descongelen. Inmediatamente, la suspensión fue centrifugada a 2300xg durante 15 minutos a 4°C y el pellet fue resuspendido en PBS (este paso se realizó dos veces).

Por otro lado, se trabajó con un lisado de oreja de ratón sano el cual fue obtenido de acuerdo al procedimiento de extracción de amastigotes en la sección 7.5.1.3 y cuya concentración de proteínas fue establecida por espectrofotometría a 280nm en el Nanodrop 2000.

Los amastigotes axénicos/obtenidos de oreja de ratón infectado, lisado de oreja de ratón sano, epimastigotes de *T. cruzi* y PBMC se fijaron en formaldehído al 1% diluido en PBS a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, las células fueron centrifugadas y



resuspendidas en PBS para ser utilizados en los siguientes ensayos.

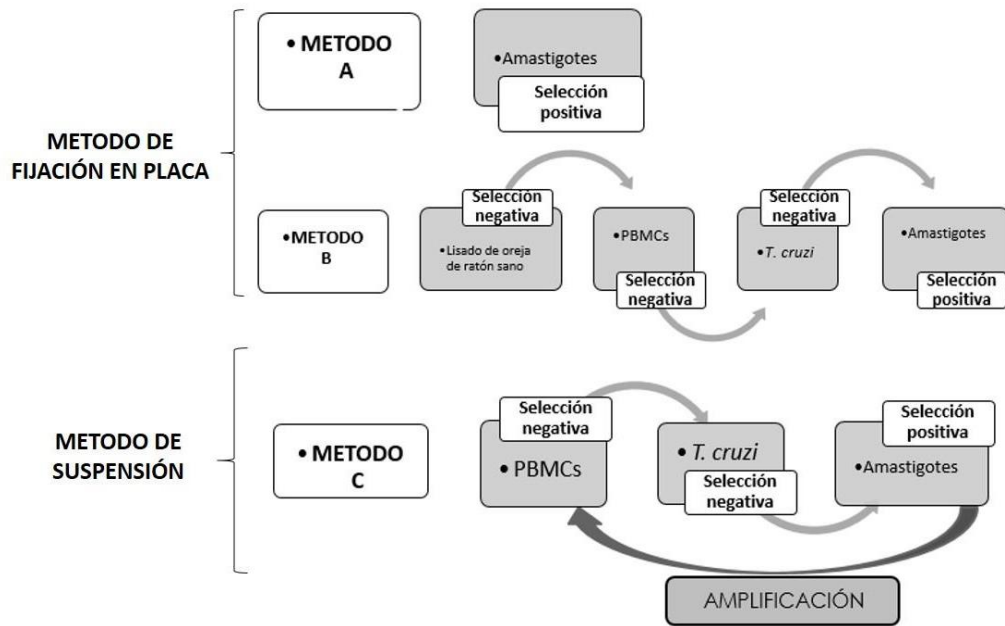
La concentración de los amastigotes, epimastigotes y PBMC, se determinó mediante la coloración con azul de tripano y conteo en una cámara de Neubauer con el fin de determinar la cantidad de células a agregar en los ensayos de ELISA, IFI y Western blot.

### **7.5.2 Selección de fagos-sdAbs candidatos**

Para la identificación de los fagos-sdAbs afines a los amastigotes axénicos del género *Leishmania*, se procedió con la selección y bio-cribado de los fagos de la biblioteca “PREDATOR” siguiendo los protocolos descritos por Tomlinson. (2002), utilizando placas de ELISA MaxiSorp.

#### **7.5.2.1 “Bio-cribado” contra amastigotes**

El proceso de bio-cribado permitió la selección de fagos-sdAbs afines contra las células de amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*. Para tales fines, en el proyecto de investigación se diseñaron 3 métodos que se mencionan en la Figura 15.



**Figura 15.** Esquemas de selección en el proceso de bio-cribado para obtener fagos-sdAbs afines a los amastigotes de *Leishmania*.

**Método A:** El esquema de trabajo se basó en un paso de bio-cribado al cual se le denominó como selección positiva que consistió en adicionar la biblioteca al antígeno y eluir los fagos-sdAbs afines.

Un total de  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* diluidos en PBS fueron fijados en un pozo de una placa de ELISA (Maxisorp) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Luego, el pozo fue bloqueado con MPBS al 4% (leche descremada en polvo al 4% en PBS) por 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, el pozo de la placa fue lavado tres veces con PBS y se le agregó  $10^{12}$  fagos-sdAbs de la biblioteca PREDATOR diluidos en MPBS al 4%. La placa fue incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, el pozo se lavó con PBST-0.1% (Tween al 0.1% en PBS) y PBS por unas 20 veces en cada caso para retirar los fagos-sdAbs no afines. Los fagos-sdAbs afines a los amastigotes fueron eluidos con  $100\mu\text{L}$  de tripsina (1 mg/mL diluido en PBS), luego de la incubación por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación los fagos eluidos con tripsina fueron colocados en hielo.

A continuación, se procedió al paso de infección de las células de *E.coli* TG1 con los fagos extraídos. Cincuenta microlitros de la suspensión de los fagos extraídos fueron utilizados para inocular 3mL de cultivo de *E.coli* TG1  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0.4 en medio 2xTY (triptona 1.6%, extracto de levadura 1% y NaCl 0.5). Las células fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos sin agitación y luego fueron centrifugadas a  $2300\times g$  durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de medio 2xTY y sembrado por diseminación en una placa con agar TYE (agar base 1.5%, NaCl 0.8%, triptona 1% y extracto de levadura 5%) con  $100\mu\text{g/mL}$  de ampicilina (TYE-AP). La placa se

incubó a 37°C por toda la noche y a las colonias obtenidas al día siguiente se les denominó como clones del método A.

**Método B:** La característica de este esquema fue la inclusión de previos pasos de selección negativa con otros complejos celulares. Para lograr esto, se fijaron  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, 10 ug de lisado de oreja de ratón sano,  $10^6$  PBMC y  $10^6$  epimastigotes de *T. cruzi* en diferentes pozos de la placa de ELISA (Maxisorp) a 37°C por toda la noche. El pozo con los amastigotes axénicos y el lisado de oreja sana fueron bloqueados por 2 horas con MPBS al 4% y los demás con BSA al 3% (diluido en PBS). Luego, la placa fue lavada con PBS y  $10^{12}$  fagos de la biblioteca “PREDATOR” se adicionaron al pozo con el lisado de oreja de ratón sano y se incubó por 2 horas. El sobrenadante se trasladó al pozo fijado con PBMC y luego de 2 horas de incubación, nuevamente el sobrenadante fue colocado en el pozo con epimastigotes de *T. cruzi*. Al final, el sobrenadante recuperado se trasladó al pozo con el blanco de estudio (amastigotes axénicos) y se procedió de la misma manera que en el método A para la elución de los fagos y la infección.

**Método C:** El método fue parecido al método B con la diferencia de que el proceso de selección fue realizado en tubos de micro-centrifuga con la inclusión de un paso de amplificación que se basó en el crecimiento de las clonas obtenidas del bio-cribado y su inducción para producir fagos para una nueva selección. En la selección negativa,  $10^{12}$  fagos de la biblioteca PREDATOR diluidos en BSA al 3% se agregaron a un tubo de micro-centrifuga con  $10^6$  células de PBMC y se incubó durante 1 hora. La mezcla de fagos con los PBMC fue centrifugada a 400xg por 15 minutos y el sobrenadante se

trasladó a un tubo de micro-centrifuga con  $10^6$  epimastigotes *T. cruzi*; se incubó durante 1 hora (selección negativa). Seguidamente, la mezcla de fagos con los epimastigotes fue centrifugado a 2300xg durante 10 minutos y el sobrenadante se trasladó a un tubo de micro-centrifuga con  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*; se incubó durante 1 hora (selección positiva). Al finalizar la incubación, la mezcla de fagos con amastigotes fue centrifugado a 2300xg durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido en PBS-T 0.1%. El proceso fue repetido 9 veces y finalmente se procedió a un último lavado con PBS. El pellet obtenido del último lavado se incubó con 100uL tripsina 1mg/mL de diluida en PBS por 30 minutos y se procedió con la infección de células de *E. coli* TG1 tal como se ha descrito en el método A.

A diferencia de los métodos A y B se incluyó un paso de amplificación de los fagos seleccionados. Los clones obtenidos luego de la infección con TG1 se resuspendieron en 50 mL de medio 2xTY con 100ug/mL de AP (2xTY-AP) con un  $OD_{600nm}$  de 0.1. El cultivo se incubó a 37°C hasta un  $OD_{600nm}$  de 0.4 y se le adicionó  $5 \times 10^{10}$  fagos KM13. El cultivo se incubó a 37°C durante 1 hora sin agitación y fue centrifugado a 2300xg durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 50 ml de medio 2xTY con 100ug/mL de AP y 50  $\mu$ g/mL de kanamicina (2xTY-AP-KAN) y se incubó a 30°C durante 20 horas. Terminado el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 2300xg durante 10 minutos. Se rescató el sobrenadante y se incubó con 10 mL de PEG/NaCl (20% polietilenglicol 6000, 2.5 M NaCl) a 4°C durante toda la noche para precipitar los fagos. La mezcla con los fagos fue centrifugada a 3300xg durante 30 minutos y los fagos fueron resuspendidos en 2 mL de PBS. Los fagos obtenidos se usaron para un

nuevo proceso de bio-cribado con amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana* dando como producto final los clones del método C.

### **7.5.2.2 Selección de fagos-sdAbs por fago-ELISA**

Los clones de las placas con TYE-AP de los métodos A, B y C del proceso de bio-cribado se picaron al azar y se sembraron individualmente en 100µL de medio 2XTY-AP en cada pozo de una microplaca de cultivo de 96 pozos y se incubó a 37°C por toda la noche en agitación en una caja húmeda. Al día siguiente, los clones sembrados en la microplaca fueron criopreservados en glicerol al 20% y se almacenaron a -80°C.

#### **7.5.2.2.1 Selección de fagos-sdAbs mediante ensayo de ELISA**

El propósito de este ensayo fue escoger a los clones más afines a los amastigotes del género *Leishmania* de todos los fagos extraídos del proceso anterior.

El procedimiento empezó con el repique de los clones de la microplaca previamente trabajada en una nueva microplaca con 200µL de medio 2XTY-AP por pozo. La microplaca se incubó por 2 horas a 37°C en agitación y luego se le adiciona 10<sup>9</sup> fagos KM13/pozo diluidos en medio 2XTY-AP para la super infección. Después de realizarse la super infección, la microplaca fue centrifugada a 810xg durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido en medio 2XTY-AP-KAN e incubado a 30°C durante toda la noche. La microplaca fue centrifugada a 810xg durante 30 minutos y el sobrenadante se trasladó a una nueva placa que contenía 50µL de PEG/NaCl y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la microplaca fue centrifugada a 810xg por 30min y el pellet con los fagos-sdAbs fue resuspendido en 200µL de PBS. Una vez producidos los fagos de cada clon, se procedió a la evaluación de cada uno

mediante un ensayo de ELISA. Para los métodos A y B se trabajó con  $10^6$  amastigotes diluidos en PBS por pozo con un control de bloqueo (BSA al 3 %). En el caso del método C, se trabajó con  $10^6$  amastigotes/pozo y con un control de bloqueo (BSA al 3%), así como un control negativo (epimastigotes de *T. cruzi*).

El protocolo de ensayo de ELISA para los métodos A, B y C fue el mismo y se menciona a continuación. La cantidad de  $10^6$  amastigotes axénicos,  $10^6$  epimastigotes de *T. cruzi* y BSA al 3% fueron adicionados a cada pozo en la placa de ELISA de 96 pozos y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se adicionó 200  $\mu$ L de BSA al 3 % a cada pozo para bloquear y se incubó a temperatura ambiente por 3 horas. Seguidamente, la placa de ELISA se lavó con PBS y a cada pozo se le adicionó 50  $\mu$ L de BSA al 3% y 50  $\mu$ L de cada fago-sdAb producido en el anterior paso. La placa se incubó por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS-T 0.1%. A continuación, el anticuerpo secundario HRP-anti-M13 en una dilución de 1:4000 en BSA al 3% se agregó a cada pozo de la placa de ELISA y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La respuesta fue detectada con 100 $\mu$ L del sustrato cromogénico 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. La respuesta se midió mediante la absorbancia registrada a 450nm y 650nm en un espectrofotómetro (lector de microplacas de ELISA BIO-RAD iMark™). A partir de los resultados, aquellos candidatos con los ratios más altos (Lee *et al.*, 2007; Petropoulos, 2012) (absorbancia del antígeno/ absorbancia de control de bloqueo o control negativo) fueron seleccionados.

#### 7.5.2.2.2 Verificación de los fagos-sdAbs mediante ensayo de ELISA

Con el propósito de re-examinar los candidatos con concentraciones conocidas de los fagos-sdAbs (característica carente en el ensayo anterior), se procedió a la producción de los fagos-sdAbs en un cultivo de 50mL.

El procedimiento incluyó los mismos pasos que en el caso de la producción de fagos en microplaca con la diferencia que los cultivos fueron realizados en un volumen mayor de medio. Brevemente, cada clon candidato de la microplaca almacenada a -70°C con las células de *E. coli* TG1 infectadas con los fagémidos se inoculó en las placas de TYE-AP y se incubaron a 37°C por toda la noche. A partir de una clona de la placa TYE-AP, se obtuvo un cultivo con un OD<sub>600nm</sub> de 0.4; el mismo que fue infectado con  $2.5 \times 10^{11}$  fagos KM13 a 37°C por una 1 hora. Seguidamente, el cultivo fue centrifugado a 2500xg durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido en 50 mL de medio 2xTY-AP-KAN y se incubó a 30°C durante 20 horas. El cultivo fue centrifugado a 3000xg durante 10 minutos; y 40mL del sobrenadante se incubó con 10mL con PEG/NaCl a 4°C por toda la noche. Después, la mezcla con los fagos precipitados fue centrifugada a 3000xg durante 30 minutos y el pellet fue resuspendido en 2mL de PBS.

La concentración de los fagos se determinó mediante la lectura en un espectrofotómetro a 269nm y 320nm; y el cálculo se realizó con la siguiente fórmula en base a lo reportado por Labrou, (2014):

$$\text{fagos/ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 6 \times 10^{16}}{\text{número de bases del fago}}$$

El ensayo de ELISA se realizó con el fin de verificar si la afinidad de los fagos-sdAbs



candidatos era específica contra el género *Leishmania*. El procedimiento se realizó de la misma manera que el ensayo de ELISA en el procedimiento anterior con la diferencia que se analizaron diferentes parámetros que son:

- a) La estandarización del tampón de bloqueo entre MPBS al 4% y BSA al 3% de la respuesta de los fagos-sdAbs en una dilución 1:4 contra amastigotes axénicos.
- b) La respuesta de la dilución 1:4 de los fagos-sdAbs contra una concentración definida de  $10^6$  amastigotes axénicos con el respectivo blanco de bloqueo.
- c) La respuesta de  $10^{13}$  fagos sdAbs/mL de los candidatos contra  $10^6$  amastigotes axénicos,  $10^6$  epimastigotes de *T. cruzi* y  $5 \times 10^5$  PBMC.
- d) El análisis de  $10^{13}$  fagos-sdAbs/mL contra  $10^5$  amastigotes extraídos de oreja de ratón y su equivalente en absorbancia<sub>280nm</sub> del lisado de oreja de ratón sano.

Brevemente, los amastigotes axénicos, epimastigotes de *T. cruzi*, PBMC, amastigotes extraídos de oreja de ratón y lisado de oreja de ratón sano fueron adicionados a los pozos de la placa de ELISA y se incubó a 37°C durante toda la noche. A continuación, la placa de ELISA fue bloqueada con BSA al 3% y se incubó a temperatura ambiente por 3 horas. Luego, la placa de ELISA se lavó tres veces con PBS y a los pozos se les adicionó los fagos-sdAbs diluidos en BSA al 3%; y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos. Nuevamente, la placa se lavó cuatro veces con PBS-T 0.1% y se adicionó el anticuerpo secundario anti-fago M13-HRP diluido 1:4000 en BSA al 3%. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con PBS-T 0.1%. La detección se realizó con 100 µl del sustrato cromogénico

TMB y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. La reacción se detuvo con 50µL/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y la absorbancia a 450nm y 650nm en un lector de microplacas de ELISA BIO-RAD iMark™.

### **7.5.3 Producción de los sdAbs a partir de los candidatos definidos y su evaluación contra amastigotes axénicos**

Después de la selección de los fagos-sdAbs candidatos en los pasos anteriores, con el propósito de obtener y producir los sdAbs sin las proteínas del fago; se procedió al subclonamiento del sdAb, su expresión y purificación como proteína soluble.

#### **7.5.3.1 Clonamiento en plásmido pET22b(+)**

El proceso de clonamiento se realizó con la finalidad de extraer el ADN del sdAb del fagémido para insertarlo en el vector pET22b(+) para el sistema de expresión de *E. coli*. Para tal fin, los clones seleccionados por el bio-cribado fueron colocadas en 5mL de medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%) y se incubó a 37°C durante 16 horas.

A partir del cultivo se procedió a extraer el fagémido de las células *E. coli* TG1 infectadas siguiendo las instrucciones del kit de extracción de plásmido (GeneJET *Plasmid Miniprep Kit*). La concentración del ADN del fagémido se midió por espectrofotometría a 260nm en Nanodrop 2000.

El fagémido fue digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* en base a lo mencionado en la Tabla 04. La reacción de digestión se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 4 horas; luego, las enzimas fueron inactivadas a 65°C por 15 minutos.

**Tabla 04.** Componentes de la reacción de digestión del ADN del fagémido con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI*.

| <b>Componentes</b>                       | <b>Concentración inicial</b> | <b>Concentración 1x</b> | <b>Volumen</b> |
|--|------------------------------|-------------------------|----------------|
| <b>Agua libre de nucleasas</b>           | -                            | -                       | μL             |
| <b>Tampón Fast Digest</b>                | 10 x                         | 1 x                     | 2,0 μL         |
| <b>Enzima de restricción <i>NcoI</i></b> | 20 reacciones                | 1 reacción              | 2,0 μL         |
| <b>Enzima de restricción <i>NotI</i></b> | 20 reacciones                | 1 reacción              | 2,0 μL         |
| <b>ADN del fagémido</b>                  | -                            | 5 – 10 ug               |                |
| <b>Volumen total</b>                     |                              |                         | 25 μL          |

Los fragmentos del ADN generados fueron separados por electroforesis en agarosa al 1% a 80 V por 1 hora en buffer TBE 0.5 X (Tris-borato 45 mM y EDTA 1 mM) y el ADN del sdAb (aprox. 400pb), se purificó utilizando el kit de recuperación de ADN de gel (Zymoclean) siguiendo las instrucciones del fabricante

El fragmento de ADN del sdAb purificado continuó al proceso de ligación en el vector pET22b(+), previamente linealizado (mediante la digestión con *NcoI* y *NotI* y purificado de gel de agarosa). La Tabla 5 muestra los componentes de la reacción de ligación en el orden que fueron adicionados, donde la cantidad de μg del fragmento de ADN del inserto (sdAb) se determinó con un ratio molar de 5:1.

**Tabla 05.** Componentes de la reacción de ligación del fragmento de ADN del sdAb con el vector pET22b(+).

| <b>Componentes</b>                  | <b>Concentración inicial</b> | <b>Concentración final</b> | <b>Reacción de ligación</b> | <b>Control de ligación</b> |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>Agua libre de nucleasas</b>      | -                            | -                          | - $\mu\text{L}$             | - $\mu\text{L}$            |
| <b>Tampón para la enzima ligasa</b> | 10 x                         | 1 x                        | 2,0 $\mu\text{L}$           | 2,0 $\mu\text{L}$          |
| <b>ADN del vector pET22b(+)</b>     | -                            | 0,1 $\mu\text{g}$          | - $\mu\text{L}$             | - $\mu\text{L}$            |
| <b>ADN del inserto (sdAb)</b>       | -                            | 0,04 $\mu\text{g}$         | - $\mu\text{L}$             | No se adicionó             |
| <b>Enzima ADN ligasa T4</b>         | 5U/ $\mu\text{L}$            | 1 U                        | 0,2 $\mu\text{L}$           | 0,2 $\mu\text{L}$          |
| <b>Volumen total</b>                |                              |                            | 20 $\mu\text{L}$            | 20 $\mu\text{L}$           |

La reacción de ligación se incubó a 4°C durante toda la noche, el cual permitió la fusión del ADN del sdAb (inserto) con una secuencia que codificará una etiqueta de c-myc y poli-histidina en el extremo C-terminal.

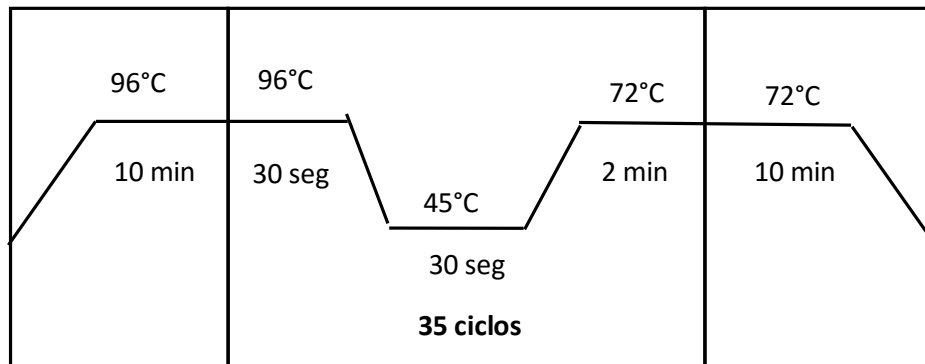
Para realizar la transformación, se colocó 60 $\mu\text{L}$  de células de *E. coli* XL1b competentes y 5 $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación en una cubeta de electroporación de 0.2cm, en hielo.

La electroporación se realizó utilizando micropulso de 2.5KV en el electroporador (Gene Pulser II – BIORAD). Luego, las células transformadas fueron resuspendidas en 500µL de LB y colocadas en un tubo de 1.5mL. Las células fueron incubadas a 37°C por una hora en agitación. Cien microlitros fueron sembrados por diseminación en placas TYE-AP y las placas fueron incubadas a 37°C por toda la noche.

Las colonias de *E. coli* XL1b transformadas con la reacción de ligación fueron picadas con un mondadiente estéril y colocadas en 40µL de agua libre de nucleasas. La lisis celular fue realizada a 99°C por 3 minutos. El ADN liberado fue utilizado para realizar el análisis de recombinantes por PCR utilizando los primers T7F y T7R (Anexo 1). Las reacciones de PCR fueron realizadas según las condiciones mostradas en la Tabla 6 y Figura 16. Por otro lado, el mondadiente previamente trabajado se incubó en caldo 2xTY-AP a 37°C por toda la noche.

**Tabla 06.** Componentes de la reacción de PCR de ADN de colonia usando la enzima ADN polimerasa HotStarTaq.

| <b>Componente</b>                | <b>Concentración inicial</b> | <b>Concentración final</b> | <b>Volumen 1x</b> |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <b>H2O libre de nucleasas</b>    |                              |                            | 11,5 $\mu$ L      |
| <b>Tampón PCR 10x</b>            | 10x                          | 1x                         | 2,5 $\mu$ L       |
| <b>dNTP's</b>                    | 10mM                         | 0,2 mM                     | 0,5 $\mu$ L       |
| <b>Primer T7 f</b>               | 10uM                         | 0,4 uM                     | 1,0 $\mu$ L       |
| <b>Primer T7 r</b>               | 10uM                         | 0,4 uM                     | 1,0 $\mu$ L       |
| <b>ADN Polimerasa</b>            | 5U/uL                        | 0,5U/Rx                    | 0,1 $\mu$ L       |
| <b>H2O con ADN de la colonia</b> |                              |                            | 8,4 $\mu$ L       |
| <b>Volumen final</b>             |                              |                            | 25 $\mu$ L        |



**Figura 16.** Protocolo de ciclado de PCR de ADN de colonia con ADN polimerasa HotStarTaq.

Finalizado el proceso de PCR, los productos de amplificación fueron separados por electroforesis a 80V por 1 hora en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5 X y el ADN visualizado con luz UV. Los clones recombinantes que presentaron bandas de amplificación (aprox. 500pb) se seleccionaron para la purificación del plásmido a partir de los cultivos realizados previamente en medio LB.

Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados con el primer universal T7 iniciador (Macrogen USA) y la secuencia de aminoácidos traducida de los sdAb obtenidos fue alineada con la secuencia del sdAb HEL4 con código de acceso (GenBank: CQ761108.1) mediante el programa CLC Sequence viewer versión 7 (<http://www.clcbio.com>).

### **7.5.3.2 Expresión en sistema de *E. coli* BL21g**

El sistema de expresión de *E. coli* BL21g se fundamentó en la expresión del promotor T7lac (característica del vector pET22b(+)) mediante la inducción por IPTG.

Para la expresión del sdAb en base a lo reportado por Mandrup *et al.*, (2013), se transformaron células de *E. coli* BL21g por electroporación con 10ng del plásmido pET22b(+) ligado al sdAb descrito en la sección 7.5.3.1. Uno de los clones recombinantes fue sembrado en 3mL de medio 2xTY-AP y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, en 100mL de medio 2xTY-AP fue inoculado con 1 mL del cultivo previamente sembrado y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar un OD<sub>600nm</sub> de 0.6. Inmediatamente, se adicionó IPTG a una concentración de 1 mM para la inducción de la expresión del sdAb y se incubó a 30°C durante toda la noche en agitación. Al día siguiente, el cultivo fue centrifugado a 9000xg durante 20 minutos y



el sobrenadante fue recuperado y filtrado en una membrana con un poro de 0.45µm.

### **7.5.3.3 Purificación de los sdAbs mediante columnas de proteína A**

Cabe mencionar que el vector pET22b(+) cuenta con el péptido señal pelB que dirige la expresión del sdAb al periplasma de la bacteria, que por su ambiente oxidante permitió la formación de los puentes disulfuro que son importantes en el plegamiento del sdAb. La fuerza del paso de centrifugación ocasionó la liberación de los sdAbs al sobrenadante.

El sobrenadante filtrado obtenido en la sección 7.5.3.2 se mezcló con sulfato de amonio a una concentración de 30% m/v y se incubó a 4°C durante toda la noche (Mandrup *et al.*2013). La mezcla fue centrifugada a 9 000xg por 20 minutos y el pellet fue utilizado para purificar los sdAbs por cromatografía de afinidad utilizando el kit proteína A SpinTrap. Brevemente, el pellet fue resuspendido en un tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0) y dicha mezcla se transfirió a la columna de proteína, la cual se lavó dos veces con tampón de unión. Los sdAbs fueron eluidos con 400µL de tampón de elución (glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7) por centrifugación en un tubo de microcentrífuga con 15µL de tampón de neutralización (Tris-HCl 1 M, pH 9.0), en el que se colectaron dos fracciones. Durante el proceso de purificación se tomaron diferentes muestras 10µL de cada uno de los pasos.

Cada una de las muestras obtenidas fueron analizadas por electroforesis de gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%, y la concentración de las proteínas se midió por espectrofotometría a 280nm en el Nanodrop 2000.

Con la finalidad de verificar que las etiquetas de marcaje (poli-histidina y c-myc) no

fueron separadas del sdAb mediante el proceso de expresión, centrifugación (sección 7.5.3.2) y purificación (sección 7.5.3.3), se realizó un ensayo de Western blot. Brevemente, 10µL de las fracciones eluidas de la columna que contenían los sdAbs se mezclaron con tampón de muestra (Tris-HCl 0.5M, glicerol 10%, SDS 10 %, azul de bromofenol 0.5 %) y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 1 hora y 30 min. La membrana fue bloqueada con BSA al 3% por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, se incubó los anticuerpos 1:4000 penta-HRP o 1:1000 anti-c-myc y luego 1:3000 anti IgG-ratón-HRP por 1 hora a temperatura ambiente. La respuesta se reveló en una película mediante un sustrato quimioluminiscente (Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate*).

#### **7.5.3.4 Evaluación de los sdAbs por ensayo de ELISA contra amastigotes**

##### **axénicos**

Con el propósito de determinar la concentración adecuada de sdAb a utilizar en los siguientes ensayos, se realizó un ensayo de ELISA. El procedimiento se realizó en base a lo reportado por Mandrup *et al.*, (2013) Para lo cual,  $10^6$  amastigotes axénicos, epimastigotes de *T. cruzi* y PBMC se adicionaron a los pozos de una placa de ELISA en un volumen de 100µL; y se incubaron a 37°C durante toda la noche. En este caso se realizaron dos tipos de análisis:

- a) La respuesta de la dilución 1:2 de los sdAbs con las siguientes concentraciones 27, 13, 7 y 3µM contra una concentración definida de  $10^6$  amastigotes axénicos con el respectivo blanco de bloqueo.

b) La respuesta del sdAb candidato a la concentración de 13 $\mu$ M contra 10<sup>6</sup> amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis*; 10<sup>6</sup> epimastigotes de *T. cruzi* y 5x10<sup>5</sup> PBMC.

A continuación, a los pozos de la placa de ELISA se les adicionó BSA al 3% y la placa se incubó a temperatura ambiente por 3 horas para el bloqueo. Luego, la placa de ELISA fue lavada tres veces con PBS, se le adicionó los sdAbs disueltos en BSA al 3% y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Nuevamente, se lavó tres veces con PBS-T 0.05% y se le agregó 100 $\mu$ L del anticuerpo secundario penta-His-HRP (Qiagen) diluido 1:4000 en BSA al 3%. La placa se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y se lavó tres veces con PBS-T al 0.05%. Finalmente, para el revelado se agregó 100 $\mu$ L del sustrato TMB; la reacción se paró agregando 50 $\mu$ L/pocillo con 50 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se midió por espectrofotometría a 450nm y 650nm en un lector de microplacas de ELISA BIO-RAD iMark™.

#### **7.5.3.5 Evaluación de los sdAbs por ensayo de western blot contra amastigotes axénicos**

Ya que no se sabe la naturaleza del antígeno que fue reconocido por el sdAb, se realizó un ensayo de western blot con las muestras de amastigotes axénicos y PBMC contra los sdAbs producidos. La cantidad de 5x10<sup>6</sup> amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y 5x10<sup>5</sup> células de PBMC en un volumen final de 10 $\mu$ L fueron mezclados con tampón de muestra en una proporción 1:2. La mezcla fue incubada a 96°C por 10 minutos y los lisados de las células fueron separados por SDS PAGE al 15% a 200 V por 45 minutos. En seguida, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa

mediante una electrotransferencia a 100 V por 90 minutos en tampón towbin (Tris 25mM, glicina 192 mM y metanol al 20%). La membrana se sumergió en el colorante rojo de ponceau para verificar la transferencia; después se lavó dos veces con agua destilada y se dejó bloqueando en MPBS al 4% a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS y se sumergió en MPBS al 4% con 10µM del sdAb; se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó con PBS-T 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-c-myc diluido 1:1000 en MPBS al 4% y con anti IgG-HRP de ratón diluido 1:3000 en MPBS al 4% durante 1 hora cada uno. Finalmente, la membrana se lavó con PBS-T 0.1% y la reacción se reveló con un sustrato quimiolumincente para la enzima HRP compuesto de un tampón estable de peróxido de hidrógeno más luminol. La reacción se detectó en un cuarto oscuro mediante la exposición de la membrana con la película de autoradiografía por 5 y 10 minutos.

#### **7.5.3.6 Evaluación de los sdAbs por ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra amastigotes axénicos**

Con la finalidad de verificar la reacción de los sdAbs se procedió a realizar un ensayo de IFI. Para el cual, los amastigotes axénicos fijados con formaldehído, se trataron con 0,01% de tritón y 0.01M de glicina y se agregaron a la lámina porta-objetos. A continuación, la lámina se bloqueó con BSA al 1% y se incubó con el sdAb 13µM por 1 hora a temperatura ambiente. La lámina se lavó con PBS y se le agregó el anticuerpo secundario 1:2000 proteína-A-alexa 488 diluido en BSA al 1% y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Nuevamente, la lámina se lavó con PBS, y se montó

con glicerol al 80%. Las láminas se observaron en un microscopio de fluorescencia con sus respectivos controles de reacción donde a los amastigotes axénicos fijados no se les adiciono el sdAb.

#### **7.5.4 Evaluación de la respuesta de los sdAbs contra amastigotes extraídos de oreja de ratón**

Con la finalidad de observar la capacidad de detección de los sdAbs contra los amastigotes extraídos de oreja de ratón, se realizó un ensayo de ELISA. En este caso, en la placa de ELISA se colocó en cada pozo  $10^5$  amastigotes extraídos de oreja de ratón y en otro pozo su equivalente en absorbancia<sub>280nm</sub> del lisado de oreja de ratón sano. Luego, se procedió de la misma forma que en la sección 7.5.3.4; con un proceso de bloqueo con BSA al 3%, lavado con PBS-T al 0.05% e incubación con  $13\mu\text{M}$  de los sdAbs por 2 horas. Luego, se realizaron los lavados, se incubó con penta-his en una dilución 1:4000 y se reveló con TMB y la reacción se detuvo con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La reacción se midió por espectofotometría a 450 y 650nm en el lector de microplacas de ELISA BIO-RAD iMark™.

#### **7.5.5 Análisis estadístico**

Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.) y el análisis estadístico de los datos se realizó con el programa STATA. La significancia de la diferencia se evaluó mediante un análisis de T-student y ANOVA para un factor con la tabla de comparación de Scheffe, considerando una significancia del 95%. En el caso de que los supuestos de la prueba paramétrica no se cumplan, se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney).

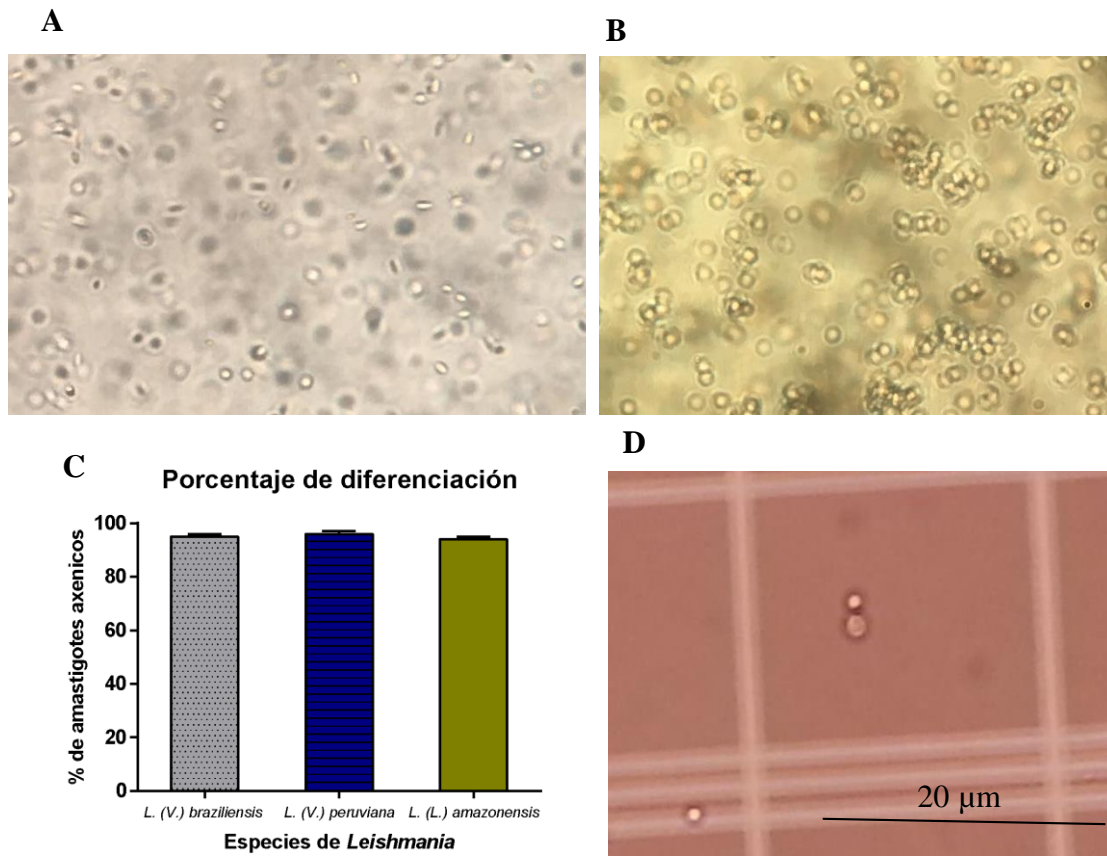
## VIII. Resultados

### 8.1 Obtención de parásitos de *Leishmania*

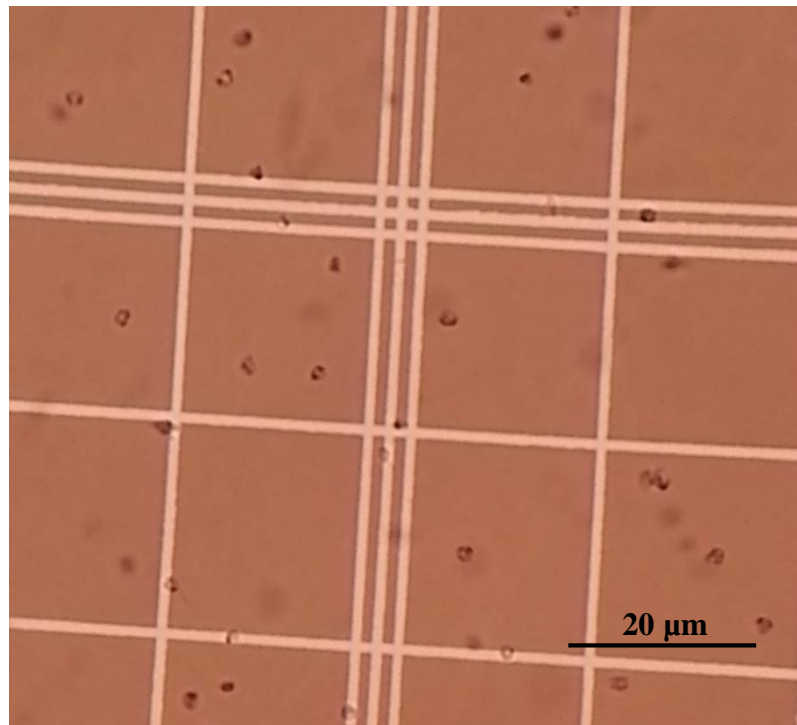
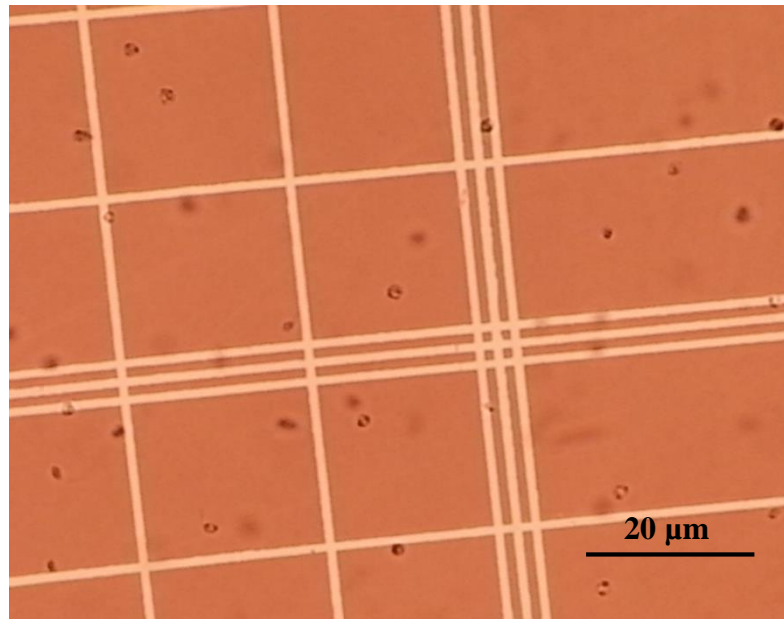
#### 8.1.1 Método “*in vitro*”

Los parásitos de *Leishmania* del método “*in vitro*” obtenidos fueron: promastigotes y amastigotes axénicos. En el caso de los promastigotes, se cosecharon las formas estacionarias del 4<sup>to</sup> día de crecimiento con un número total de  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^8$  promastigotes totales a una concentración de  $40 \times 10^6$  promastigotes/mL. Los promastigotes mostraron formas alargadas, flageladas y móviles en el caso de *L. (V.) braziliensis* (Figura 17-A) y *L. (L.) amazonensis*. Mientras que en el caso de *L. (V.) peruviana*, mostraron formas flageladas, móviles y más pequeñas en comparación a las obtenidas por *L. (V.) braziliensis*. Los promastigotes después del proceso de criopreservación y fijación, mantuvieron la forma alargada con la presencia de un flagelo, así como una coloración azulada por el azul de tripano que indicó carencia de viabilidad.

Los amastigotes axénicos obtenidos del proceso de diferenciación presentaron formas ovales y no móviles (Figura 17-B). Después del proceso de purificación con percoll, se recuperaron los amastigotes axénicos con forma oval, aflagelada y presencia de refringencia (indicación de que la membrana no estaba alterada) (Figura 17-D) con un porcentaje de diferenciación mayor al 95% en las tres especies trabajadas (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) peruviana*) (Figura 17-C). Por otro lado, después del proceso de descriopreservación y fijación con formalina al 1%, los amastigotes axénicos mantuvieron la forma oval y con una coloración azul indicando que ninguna célula era viable (Figura 18).



**Figura 17.** Diferenciación de promastigotes-amastigotes axénicos. **(A)** Imagen de los promastigotes de *L. (V.) braziliensis* por microscopia de luz, 40x. **(B)** Imagen de los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* por microscopia de luz, 40x. **(C)** Gráfica del porcentaje de diferenciación de los promastigotes a amastigotes axénicos. El porcentaje (eje y) se calculó en base al número de amastigotes axénicos presentes en el total de parasitos cuantificados en una cámara de neubauer, el eje-x, muestra la especie de *Leishmania*. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(D)** Imagen de los amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana* purificados por percoll por microscopia de luz, 40x.



**Figura 18.** Viabilidad de los amastigotes axénicos por microscopia de luz. Imagen en cámara de neubauer de los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* teñidos con azul de tripano, 40x.

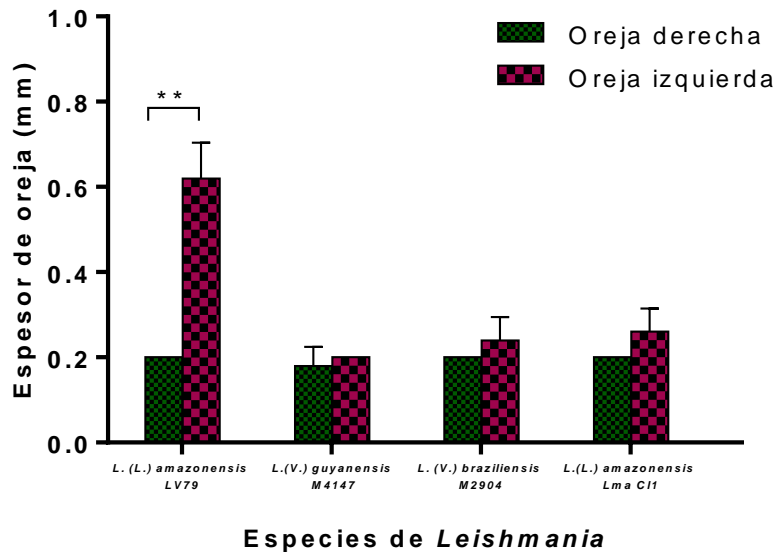


### 8.1.2 Método “*in vivo*”

Para la obtención de amastigotes de oreja de ratón BALB/c infectado se tomó en cuenta dos aspectos: (i) el aumento en la inflamación de la oreja y (ii) la presencia de formas ovales que demuestren presencia de núcleo y kinetoplasto por microscopia de fluorescencia.

En el proceso de infección, se evaluaron 4 especies de *Leishmania* que son: *L. (V.) braziliensis* M2904, *L. (L.) amazonensis* LmaC11, *L. (V.) guyanensis* M4147 y *L. (L.) amazonensis* LV79. De los cuales, en el seguimiento semanal sólo el grupo de infección con *L. (L.) amazonensis* LV79 mostró diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la oreja (Tabla 07) entre la oreja izquierda (infectada) y la oreja derecha (control) a partir de la 4<sup>ta</sup> hasta la 7<sup>ma</sup> semana de infección (Figura 19). Además en la observación por microscopia de luz y fluorescencia, se observó las formas ovales, sin flagelo de los amastigotes de *Leishmania*. Los demás grupos de infección no mostraron diferencia estadísticamente significativa en el grosor de la oreja y además no mostraron formas ovales por microscopia de fluorescencia. Por lo que se determinó seguir trabajando con las infecciones con la especie de *L. (L.) amazonensis* LV79, para lo cual los ratones de este grupo se les realizó eutanasia y los amastigotes extraídos se infectaron en nuevos grupos de 7 ratones.

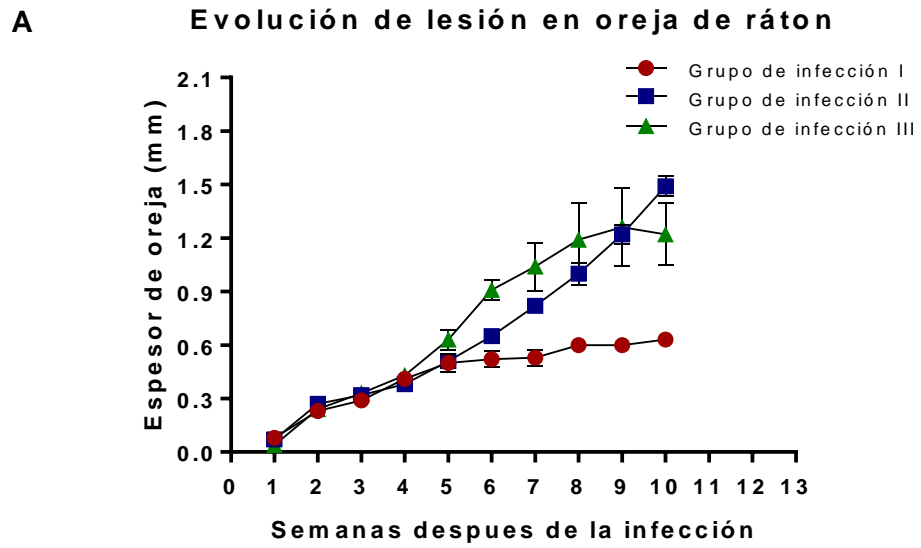
Los ratones de los nuevos grupos de infección mostraron un avance progresivo en el espesor de la oreja (Figura 20). El grupo de infección I, mostró un aumento hasta la 5<sup>ta</sup> semana mientras que los grupos de infección II y III hasta la 10<sup>ma</sup> semana, indicando que la infectividad del parásito incremento para los grupos de infección II y III.



**Figura 19.** Promedio del grosor de las orejas de ratones BALB/c machos en la 7<sup>ma</sup> semana post-infección en la oreja izquierda con 4 especies de *Leishmania*. Un total de 5 ratones machos BALB/c de 6 semanas fueron infectados en la oreja izquierda con  $10^6$  promastigotes/ml de 4 especies de *Leishmania* y el progreso del grosor fue medido hasta la 7<sup>ma</sup> semana. El eje-y del gráfico representa el espesor de la oreja y el eje-x muestra las especies de *Leishmania*. Las barras de error demuestran la desviación estándar (\*  $P \leq 0.05$ ).

**Tabla 07.** Análisis estadístico T-student de la comparación del grosor de la oreja izquierda infectada con *L. (L.) amazonensis* LV79 contra la oreja derecha no infectada en ratón BALB/c.

| Grupo           | Media | Error estándar | Desviación estándar | 95% Intervalo de Confianza |       | t     | p     |
|-----------------|-------|----------------|---------------------|----------------------------|-------|-------|-------|
|                 |       |                |                     |                            |       |       |       |
| Oreja Derecha   | 0,18  | 0,020          | 0,045               | 0,125                      | 0,236 | -10.4 | 0.001 |
| Oreja Izquierda | 0,62  | 0,038          | 0,084               | 0,516                      | 0,724 |       |       |



**B**



**C**



**Figura 20.** Infección en ambas orejas de ratón BALB/c con *L. (L.) amazonensis* LV79.

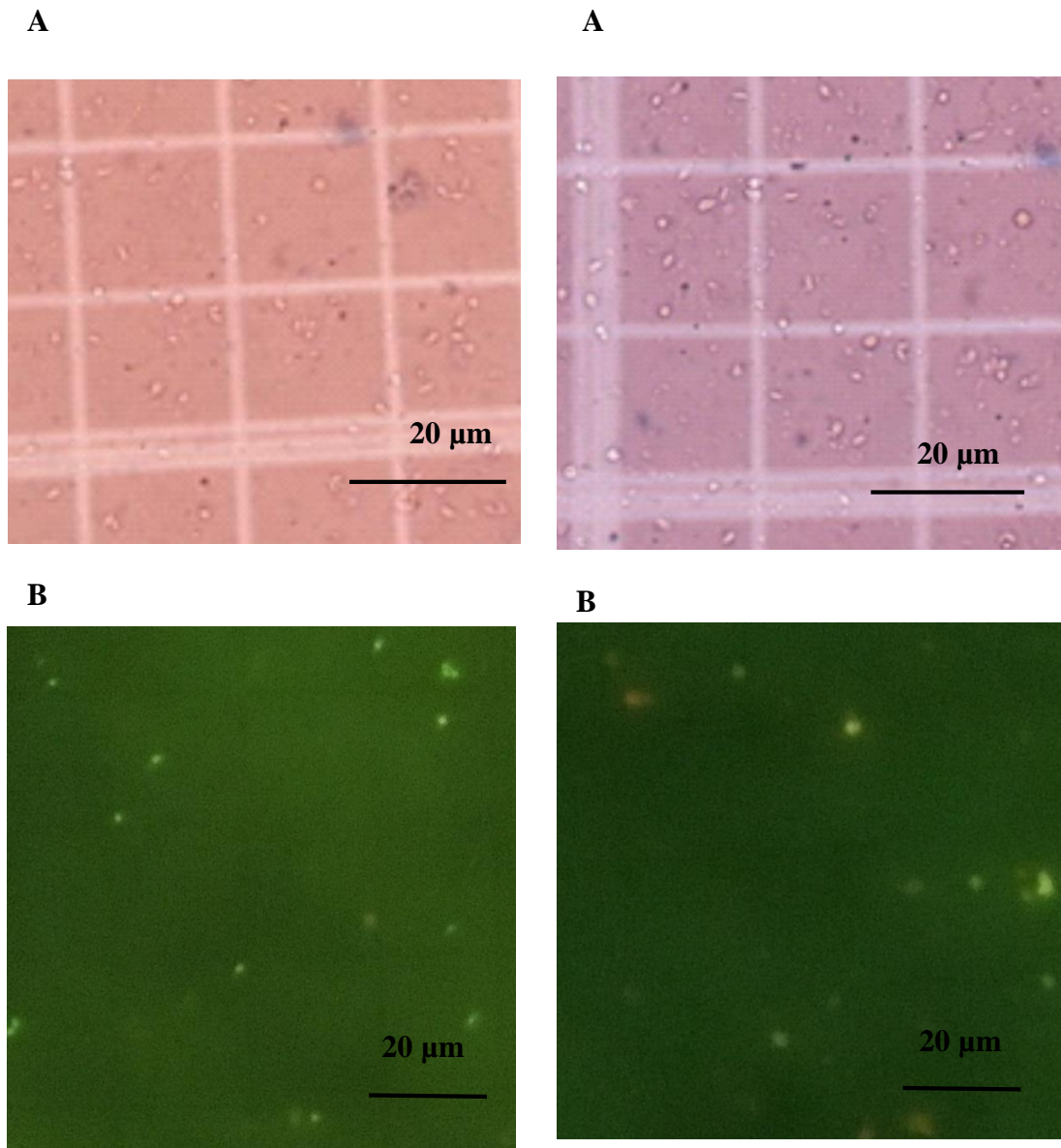
(A) Seguimiento semanal del grosor de la oreja infectada (eje y) en tres grupos de

infección con 7 individuos por grupo, el eje-x muestra las especies de *Leishmania*. Las barras de error demuestran el error estándar de la media. **(B)** Imagen ratón infectado en ambas orejas del grupo II. **(C)** Imagen de oreja de ratón infectado en ambas orejas del grupo I.

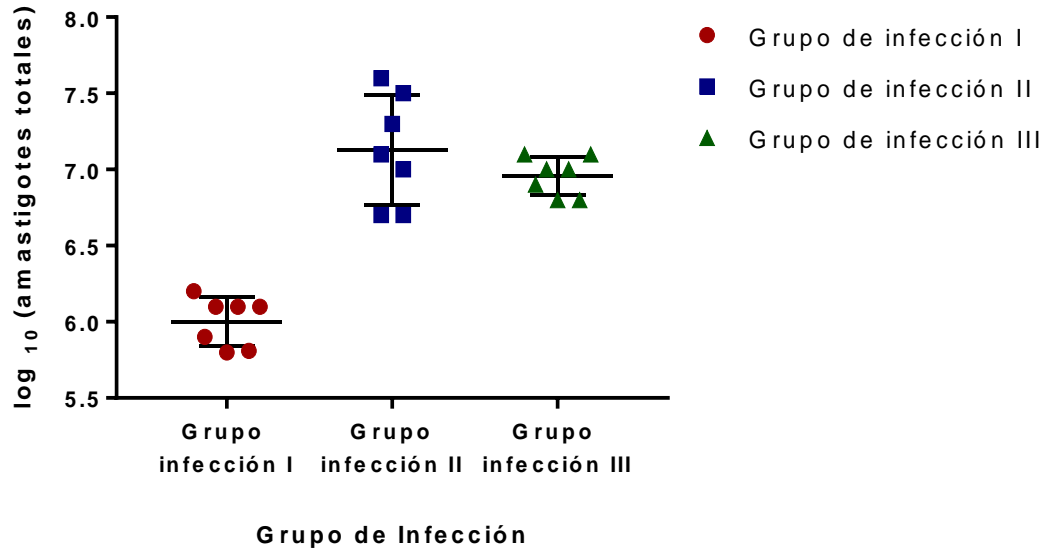
Los amastigotes aislados de las orejas infectadas por microscopia óptica mostraron formas ovales, aflageladas, no móviles con un tamaño menor a la de los amastigotes axénicos (Figura 21-A). Además, por microscopia de fluorescencia mostraron formas ovales viables donde en algunos casos se pudo observar el kinetoplasto y el núcleo (característica de los amastigotes) (Figura 21-B).

Por otro lado, a partir de la cuantificación en cámara de Neubauer por microscopia de fluorescencia se obtuvo un número total de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^7$  amastigotes por oreja de ratón (Figura 22). Además, se observó una menor cantidad de amastigotes extraídos en el grupo I de infección que coincide con su menor avance en la progresión de la lesión en comparación a los otros dos grupos de infección. Igualmente, se contempló una variabilidad en el grosor de las orejas dentro del mismo grupo de infección generando así una diferencia entre la cantidad de amastigotes extraídos de las orejas de los ratones.

En el presente trabajo de investigación, se propuso purificar los amastigotes extraídos de oreja de ratón infectado por lo que se realizó la purificación mediante un gradiente de Percoll de los aislados de la oreja de ratón. En tres experimentos realizados sólo se recuperó el 2,03% del total de amastigotes extraídos, a pesar de que en un experimento se purificó el lisado de las orejas de tres ratones infectados. Por ende, se concluyó que para los fines del trabajo la cantidad obtenida era insuficiente, por lo que se decidió trabajar con los aislados directos de la oreja infectada de ratón; realizando una centrifugación diferencial para separar el debris celular obtenido.



**Figura 21.** Observación por microscopia del lisado de oreja infectada con *L. (L.) amazonensis* LV79 de ratón BALB/c. **(A)** Imagen del lisado de oreja visualizado por un microscopio óptico de luz, 40x. **(B)** Imagen del lisado de oreja coloreado con naranja de acridina e ioduro de propidio visualizado por un microscopio de fluorescencia, 40x.



**Figura 22.** Cantidad total de amastigotes extraídos a partir de ambas orejas de ratón BALB/c infectado con *L. (L.) amazonensis* LV79. El eje-y del gráfico representa el log<sub>10</sub> de la cantidad total de amastigotes extraídos y el eje-x muestra los grupos de infección con un número de 7 ratones por grupo. Se muestra la desviación estándar en cada grupo.



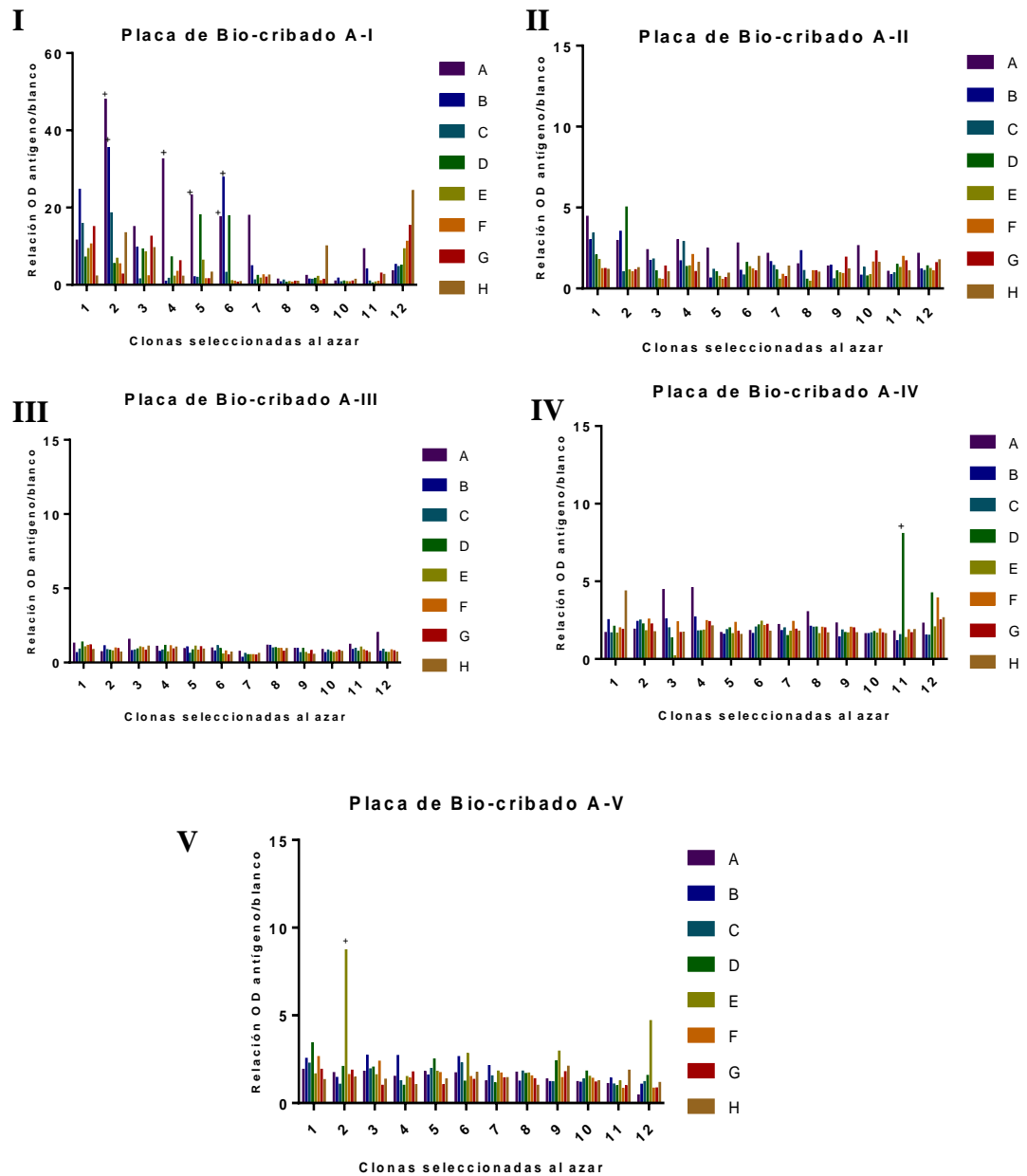
## **8.2 Selección de los fagos-sdAbs candidatos por bio-cribado y ensayo de fago-ELISA**

### **8.2.1 Bio-cribado por método de fijación en placa**

#### **8.2.1.1 Selección de clonas por método de bio-cribado por método A con inclusión de selección positiva**

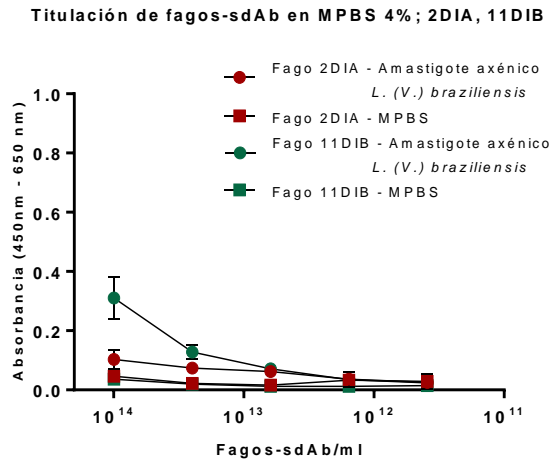
El proceso de bio-cribado generó un total de 900 clonas individuales en las placas de TYE, a partir de las cuales, se analizó 480 clonas agrupadas en cinco placas (Figura 23). En la placa de selección A-I, se observó varias clonas con valores de relación mayores a 10, sin embargo, se notó una reacción positiva en las filas 1 y 12 así como en las columnas A y H por lo que no se tomaron en cuenta en la selección por el efecto de borde. A partir de este análisis, se escogieron los mejores candidatos para evaluar si presentaban respuesta dilución dependiente como medida indirecta de especificidad. Se observó en el análisis de dos candidatos, que la respuesta disminuye por lo que se procedió a maximizar la diferencia entre la señal de fondo y la respuesta positiva cambiando el tampón de bloqueo (MPBS al 4% o BSA 3%). Se determinó al BSA 3% como el más adecuado para los demás ensayos al mostrar un aumento en la respuesta sin afectar la señal de fondo (Figura 24).

Una vez establecido que el tampón de bloqueo BSA al 3% era el adecuado, se continuó con el proceso de análisis de las clonas faltantes. En los cuales, las placas de selección A-II y A-III, evidenciaron valores por debajo de 2 y se consideraron como clonas negativos. Y las placas de selección A-IV y A-V mostraron un candidato con un valor sobresaliente en comparación al resto (Figura 23).

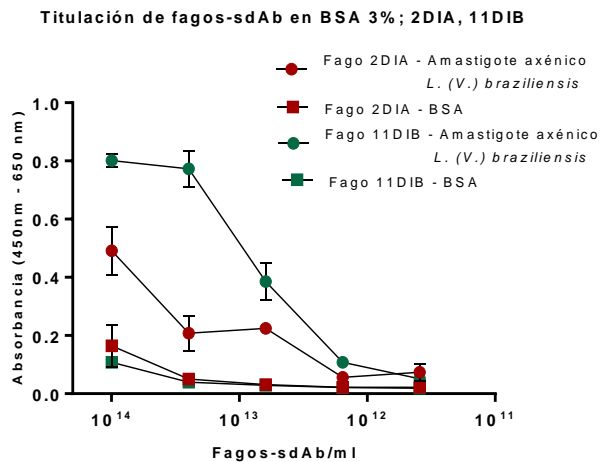


**Figura 23.** Selección de fagos-sdAbs candidatos mediante fago-ELISA de clones del método de bio-cribado A. En el eje y, I, II, III, IV y V, Placa AI, AII, AIII, AIV y AV, ratio fago-sdAb contra amastigotes/fago-sdAb contra el BSA al 3%. El eje x, posición de los fagos-sdAb en la placa de ELISA, columnas del 1 al 12 y filas de A hasta H. +: Candidatos que fueron seleccionados por placa de bio-cribado.

A



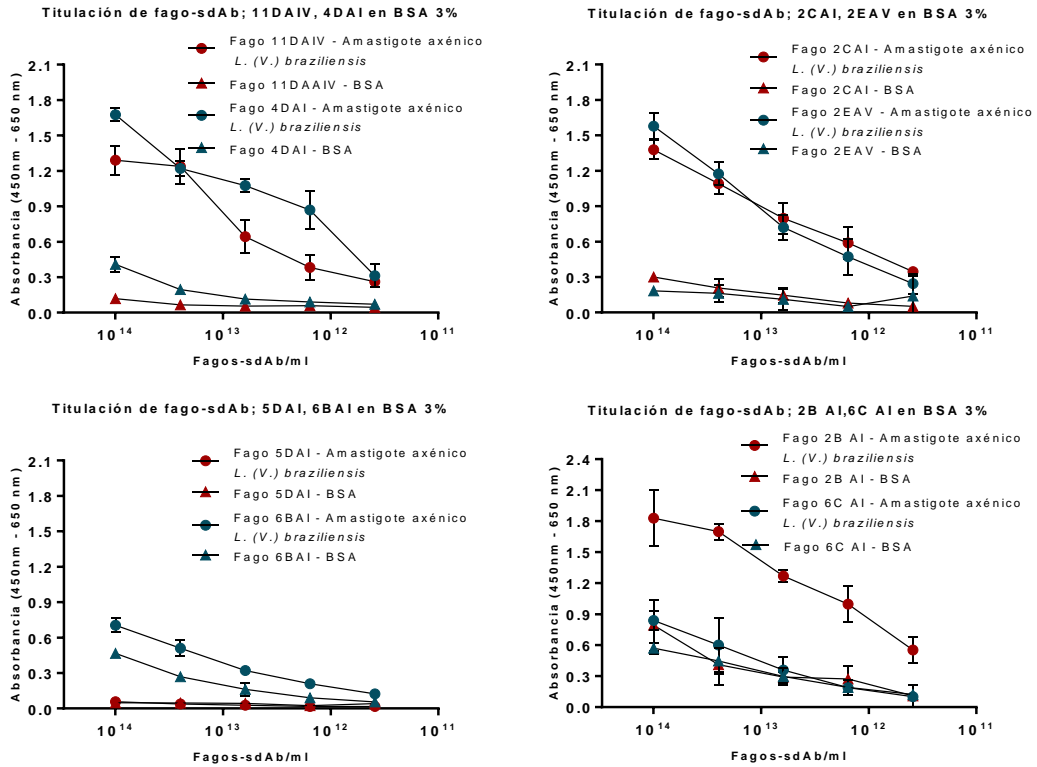
B



**Figura 24.** Estandarización del tampón de bloqueo más adecuado para los ensayos de ELISA-fago-sdAb. Las imágenes muestran los resultados de la respuesta de la dilución 1:4 de dos fagos-sdAbs candidatos contra  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* en MPBS al 4% y BSA 3%. **(A)** Tampón de bloqueo MPBS al 4%. **(B)** Tampón de bloqueo BSA al 3%. El eje-y representa los valores de la absorbancia medida y el eje-x muestra la concentración de fagos-sdAbs/mL. Las barras de error muestran la desviación estándar de dos experimentos independientes.

A partir de las 480 clones analizadas, se seleccionaron a 8 fagos-sdAbs como posibles candidatos (Figura 23) que luego se re-examinaron mediante un ensayo de ELISA y sólo se seleccionaron a los que cumplieron con los parámetros de selección que son: (i) respuesta en dilución dependiente frente a los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y (ii) la ausencia de respuesta frente a la solución bloqueadora (Figura 24). Del proceso de selección, se determinó a 4 fagos-sdAbs como candidatos que fueron los siguientes: fago-sdAb 11DAIV, fago-sdAb 4DAI, fago-sdAb 2CAI y fago-sdAb 2EAV.

Además, en la Figura 25 se observa los resultados de otros cuatro fagos-sdAbs candidatos seleccionados donde la respuesta de tres de los mismos contra los amastigotes axénicos no mostró diferencia significativa contra el tampón bloqueador. En el caso del candidato fago-sdAb 2BAI se observó una alta respuesta contra los amastigotes axénicos, sin embargo, la respuesta contra la solución bloqueadora fue por encima de 0.6 por lo que no cumplió con el parámetro de selección.



**Figura 25.** Respuesta de la dilución seriada en el proceso de bio-cribado A. Resultados de la absorbancia medida (eje y) por espectrofotometría del ensayo de ELISA con los fagos-sdAbs en una dilución 1/4 contra 10<sup>6</sup> amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y el tampón bloqueador BSA al 3%, eje-x muestra la concentración de fagos-sdAbs/mL. Las barras de error demuestran la desviación estándar de dos experimentos independientes.

### **8.2.1.2 Selección de clones por método de bio-cribado B con inclusión de selección negativa y positiva**

A diferencia del método de bio-cribado A, que fue un método de selección positiva, en ésta oportunidad se adicionaron tres pasos de selección negativa. Se removieron aquellos fagos sdAbs que se unieron a PBMC, tejido sano de oreja de ratón y epimastigotes de *T. cruzi*. La expectativa fue eliminar los fagos con reacción inespecífica para enriquecer clonas que reconocieran antígenos específicos de *Leishmania*. Luego de los tres pasos preliminares se obtuvieron un total de 872 clones a partir de las cuales se analizaron 192 clones, los cuales se enfrentaron a amastigotes axénicos enteros de *L. (V.) braziliensis* fijados sobre placas de ELISA. Después del proceso de selección, se identificó el clon fago-sdAb 5CIB como candidato en base a su respuesta contra el tampón de bloqueo.

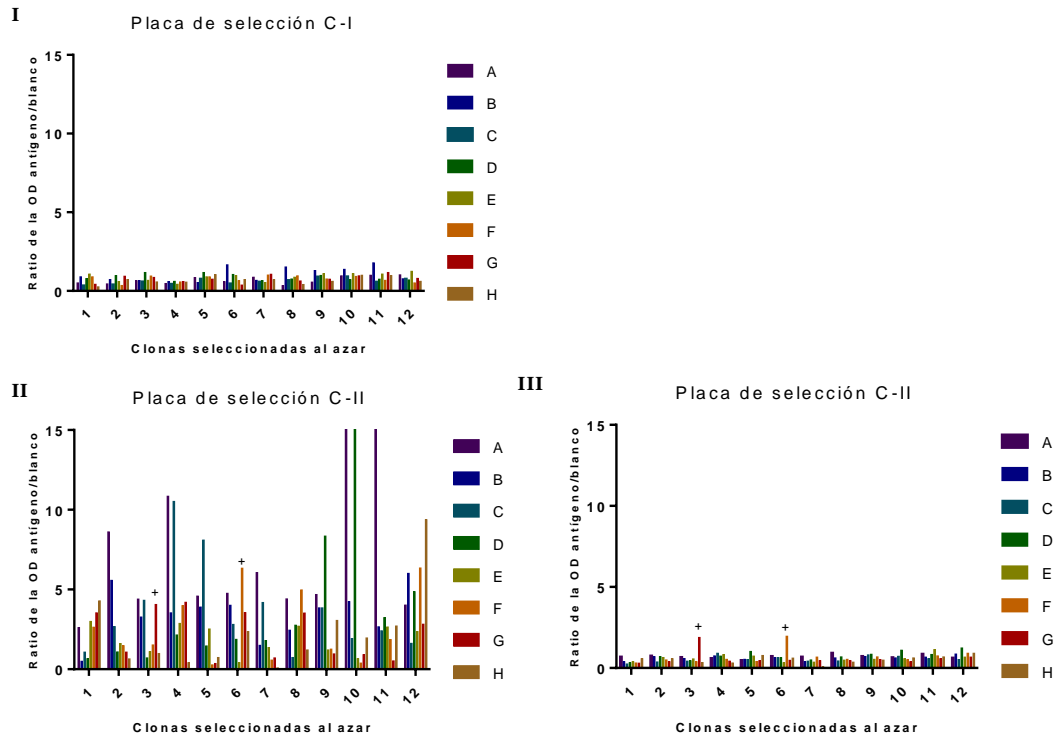
## **8.2.2 Bio-cribado por método en suspensión**

### **8.2.2.1 Selección de clones por método de bio-cribado C**

Los métodos de bio-cribado A y B por fijación en placa resultaron en la obtención de clones inespecíficos, por lo que, se optó por un método diferente como el de suspensión. Los clones obtenidos a partir del método por suspensión del bio-cribado C, se analizaron mediante un fago-ELISA contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, epimastigotes de *T. cruzi* y tampón de bloqueo. A partir de 191 clones analizados, en la placa de selección C-I no se seleccionó ningún clon (Figura 26-A), mientras que en la placa de selección C-II mostraron una mayor respuesta un total de 14 clones (Figura 26-B). Con el fin de verificar que los clones no sean inespecíficos, la

placa de selección C-II se analizó contra epimastigotes de *T. cruzi*, en la cual se mostró que de las 14 clonas positivas sólo 2 clonas mostraron una relación mayor a 2 (Figura 26-C). Por ende, sólo se consideraron los dos clones como candidatos y se denominaron como 6BIC y 3CIC.

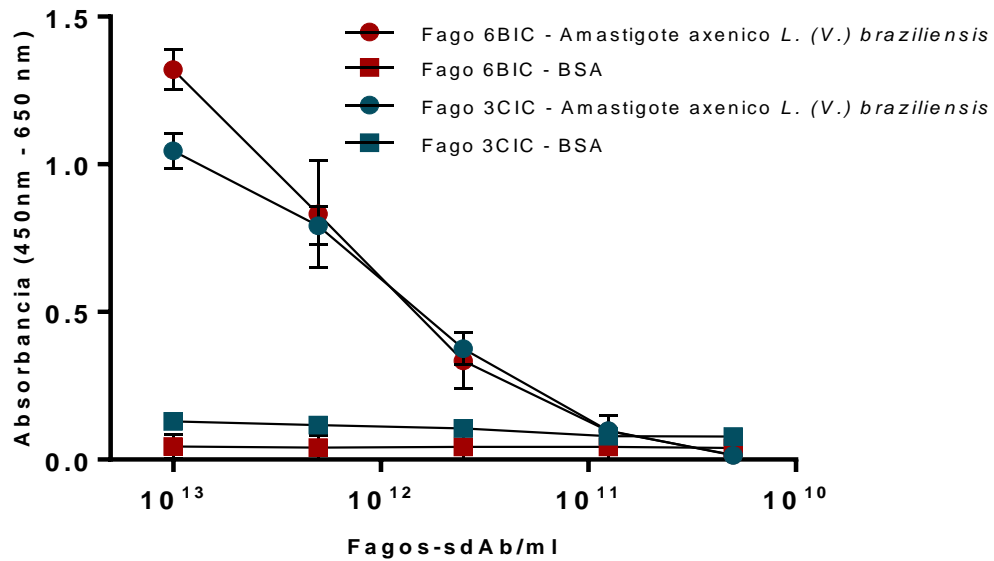
El potencial de los dos clones fago-sdAb 6BIC y fago-sdAb 3CIC en cuanto a su afinidad por *Leishmania* fueron evaluados mediante el ensayo dilución dependiente contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* por medio de un ensayo de ELISA. En la Figura 27, se evidenció que las dos clonas tienen una fuerte respuesta en ambos clones hasta una concentración de  $4 \times 10^{11}$  fagos/mL sin respuesta frente al blanco (tampón de bloqueo BSA al 3%). Además, se observó que la respuesta de los dos fagos-sdAbs candidatos frente al tampón bloqueador BSA al 3% no superó los valores de 0.3 de absorbancia medida por espectrofotometría.



**Figura 26.** Selección de los candidatos fago-sdAbs mediante fago-ELISA de clones del método de bio-cribado C. En el eje y, I y II: Placa CI y CII, ratio fago-sdAb contra amastigotes/ fago-sdAb contra el BSA al 3% y III: Placa CII, ratio fago-sdAb contra amastigotes/ fago-sdAb contra epimastigotes de *T. cruzi*. El eje x, posición de los fagos-sdAb en la placa de ELISA, columnas 1 al 12 y filas A-H. +: Candidatos que fueron seleccionados por placa de bio-cribado.



**Titulación del fago-sdAb; 6BIC, 3CIC BSA 3%**

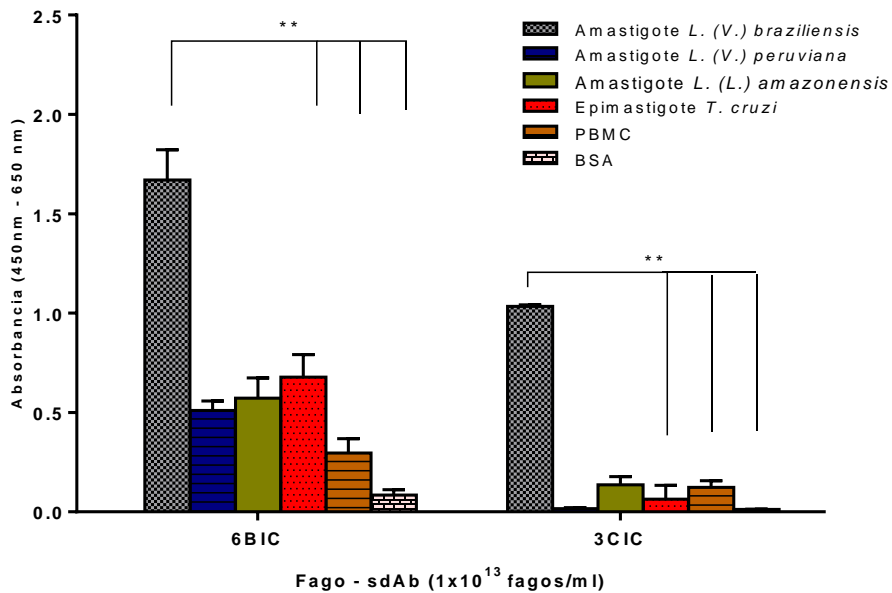


**Figura 27.** Respuesta de la dilución seriada de los fagos – sdAbs 6BIC y 3CIC candidatos contra amastigotes axénicos. Los fagos-sdAbs se diluyeron en BSA al 3% en una relación 1:4 y se enfrentaron contra  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* mediante un ensayo de ELISA. El eje-y del gráfico representa los valores de la absorbancia medida por espectrofotometría y el eje-x muestra la concentración de fagos-sdAbs/mL. Las barras de error demuestran la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Una vez establecida la reacción en dilución de los dos clones, se evaluó el perfil de unión selectiva contra amastigotes axénicos de tres especies de *Leishmania* y otros complejos celulares mediante un ensayo de fago-ELISA (Figura 28). Para eliminar los efectos en la señal por las proteínas del fago, a cada valor se le sustrajo la respuesta del fago KM13 (datos no mostrados). Los candidatos fago-sdAb 6BIC y fago-sdAb 3CIC reaccionaron contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los epimastigotes de *T. cruzi*, PBMC y BSA al 3% (controles negativos) (Tabla 8). Mientras que la reacción de los fagos-sdAbs contra amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis* en comparación a los controles negativos no tuvo diferencia estadísticamente significativa. Por lo que, los resultados de los candidatos demuestran una respuesta predominante contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*.

De la misma forma, con la finalidad de examinar si dicha respuesta fue específica al estadio, se analizó la respuesta contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis*. En ambos candidatos, se observó una señal con diferencia estadísticamente significativa contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* en comparación a los promastigotes de la misma especie (Figura 29).

Respuesta de los fagos-sdAb contra otros complejos



**Figura 28.** Evaluación de la respuesta de los fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares. Los resultados evidenciaron la reacción de  $1 \times 10^{13}$  fagos-sdAbs/mL contra  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*,  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana*,  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (L.) amazonensis*,  $10^6$  epimastigotes de *T. cruzi* y  $5 \times 10^5$  PBMC en un ensayo de ELISA. El eje-y del gráfico representa los valores de la absorbancia y el eje-x muestra el candidato fago-sdAb evaluado. Las barras de error demuestran la desviación estándar de tres experimentos independientes (\*\*  $P \leq 0.01$ ).

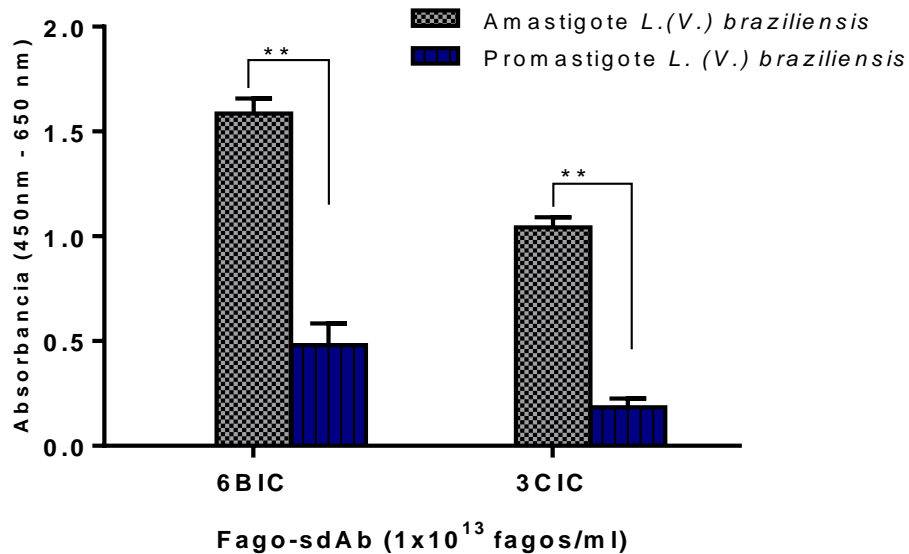
**Tabla 08.** Análisis de varianza para un factor del candidato fago-sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares.

| <b>Grupo</b>         | <b>Grados de Libertad</b> | <b>Suma de Cuadrados</b> | <b>Cuadrado de medias</b> | <b>F</b> | <b>p</b> |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|----------|
| <b>Entre grupos</b>  | 6                         | 6,3094                   | 1,0516                    | 113.72   | 0,001    |
| <b>Dentro grupos</b> | 14                        | 0,1295                   | 0, 0092                   |          |          |
| <b>Total</b>         | 20                        | 6,4388                   | 0,3219                    |          |          |

**Cuadro de comparación de Scheffe (valores de p)**

|                       | <b>Amastigotes axénicos<br/><i>L. (V.) braziliensis</i></b> | <b>Amastigotes axénicos <i>L. (V.) peruviana</i></b> | <b>Amastigotes axénicos <i>L. (L.) amazonensis</i></b> |
|-----------------------|---|--|--|
| <b><i>T.cruzi</i></b> | 0, 000  | 0,612  | 0,927  |
| <b>PBMC</b>           | 0, 000  | 0,346  | 0,123  |
| <b>BSA</b>            | 0,000   | 0,007  | 0,002  |

### Respuesta de fago-sdAb contra los estadios de *Leishmania*

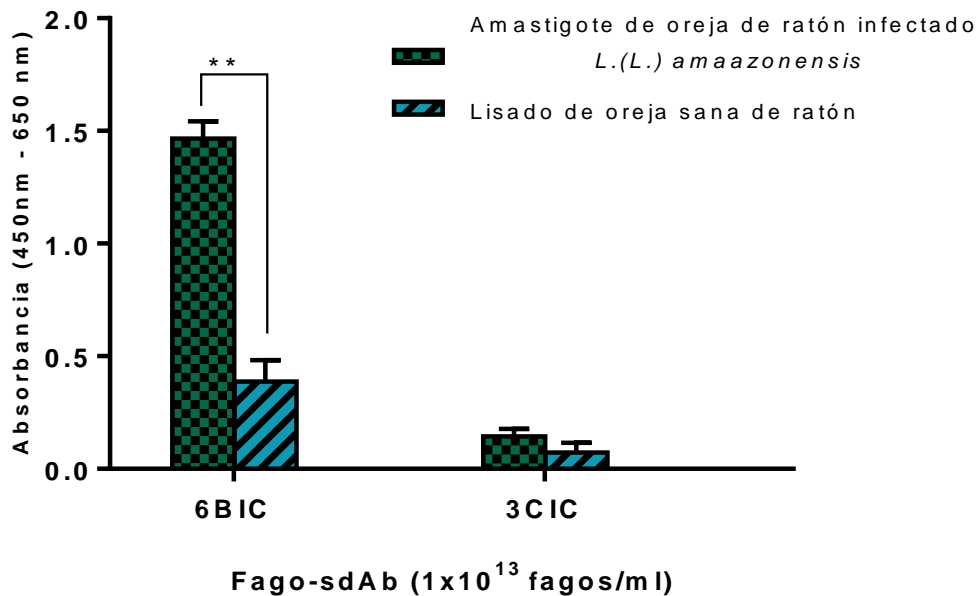


**Figura 29.** Análisis de los fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra el estadio amastigote y promastigote de *Leishmania*. La gráfica muestra los resultados del ensayo de ELISA de la reacción de  $1 \times 10^{13}$  fagos-sdAbs/mL contra  $10^6$  amastigotes axénicos y promastigotes de *L. (V.) braziliensis*. El eje-y del gráfico representa los valores de la absorbancia y el eje-x muestra el candidato fago-sdAb analizado. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes (\*\* $P \leq 0.01$ ).

No obstante, ya que el interés del estudio fue la detección de amastigotes presentes en lesiones de LC, se procedió al análisis de los fagos-sdAbs candidatos contra amastigotes extraídos de oreja de ratón. Como las lesiones sólo se obtuvieron con animales infectados con *L. (L.) amazonensis* se procedió a la evaluación de las orejas de ese experimento. Se observó que la respuesta de sólo el candidato fago-sdAb 6BIC presenta una diferencia estadísticamente significativamente (Tabla 09) en comparación a su control negativo (lisado de oreja de ratón sano) (Figura 30).

A partir de estos resultados, se determinó como candidato potencial para el proyecto de investigación al fago-sdAb 6BIC, el cual mostró respuesta contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y amastigotes de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis*.

### Respuesta del fago-sdAb contra amastigotes extraídos de oreja de ratón



**Figura 30.** Análisis de los fagos-sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes extraídos de ratón. Los resultados evidencian la absorbancia de la respuesta de  $10^{13}$  fagos/mL contra  $10^5$  amastigotes extraídos de oreja de ratón y su correspondiente control (lisado de oreja de ratón sano) mediante un ensayo de ELISA. El eje-y del gráfico representa los valores de la absorbancia y el eje-x muestra el candidato fago-sdAb analizado. Las barras de error demuestran la desviación estándar de tres experimentos independientes (\*\* $P \leq 0.01$ ).

**Tabla 09.** Análisis estadístico de T-student del fago-sdAb 6B IC contra amastigotes intracelulares extraídos de oreja infectada contra lisado de oreja sana.

| Grupo                  | Media  | Error estándar | Desviación estándar | 95% Intervalo de confianza) |       | t     | P     |
|------------------------|--------|----------------|---------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|
|                        |        |                |                     |                             |       |       |       |
| <b>Oreja infectada</b> | 1,467  | 0,044          | 0,076               | 1,277                       | 1,656 | 15, 4 | 0.001 |
| <b>Oreja Sana</b>      | 0, 388 | 0,054          | 0,095               | 0,152                       | 0,623 |       |       |



### **8.3 Clonamiento, expresión, caracterización y evaluación de capacidad de unión específica de los sdAbs**

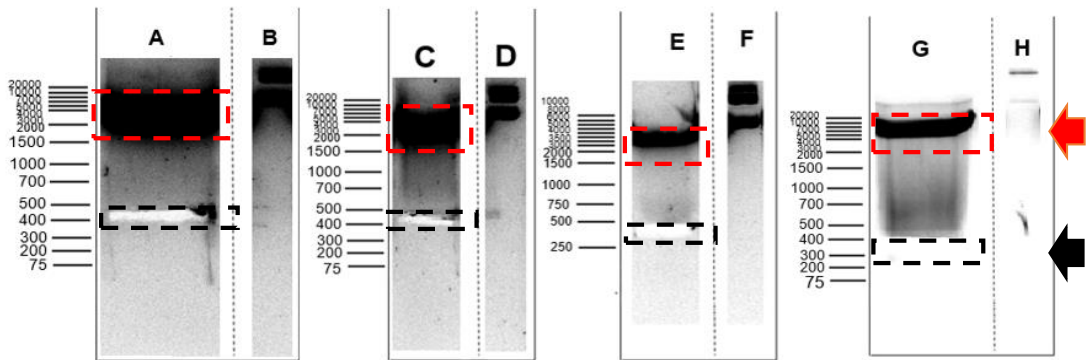
#### **8.3.1 Candidatos seleccionados por método de bio-cribado A y B**

##### **8.3.1.1 Clonamiento en pET22b(+)**

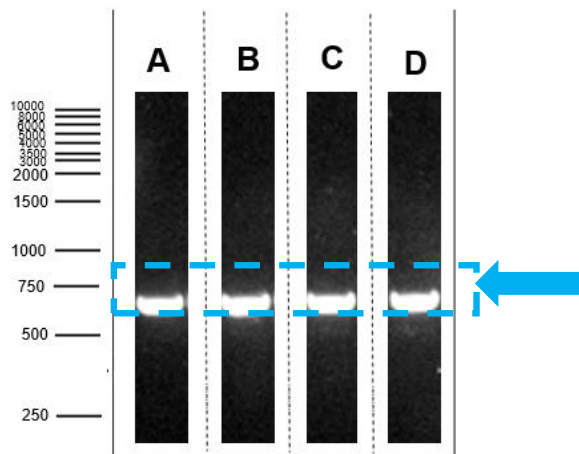
A partir del proceso de clonamiento, en el paso de digestión de los fagémidos conteniendo los sdAbs seleccionados por biocribaje, se obtuvieron fragmentos de ADN de un tamaño de 400pb (Figura 31), que corresponden al tamaño del inserto del sdAb.

El ADN del sdAb de cada candidato fue ligado al plásmido pET22b(+) y dio como resultado un promedio de 300 colonias de *E.coli* XL1b transformadas mientras que en la placa de control de ligación (autoligado) no se observó ninguna colonia.

En el ensayo de PCR de ADN de las colonias obtenidas se observó la presencia de una banda de amplificación mayor a 500 pb (Figura 32), lo que evidenció que el ADN del sdAb está ligado al pET22b(+) en la célula de *E.coli* XL1b transformada. Por otro lado, el aumento en el tamaño del fragmento de ADN se explica debido a que el sdAb incluye los marcadores poli-histidina y c-myc.



**Figura 31.** Digestión del ADN del fagémido de los candidatos con enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* en agarosa al 1%. La flecha negra indica el fragmento de 400pb extraído del gel para evitar daño del ADN por radiación UV. La flecha roja indica al fragmento de 4788 pb del fagémido. Fagémido-sdAb 2EAV digerido (A), sin digerir (B). Fagémido-sdAb 11DAIV digerido (C), sin digerir (D). Fagémido-sdAb 2CAI digerido (E), sin digerir (F). Fagémido-sdAb 4DAI digerido (G), sin digerir (H).

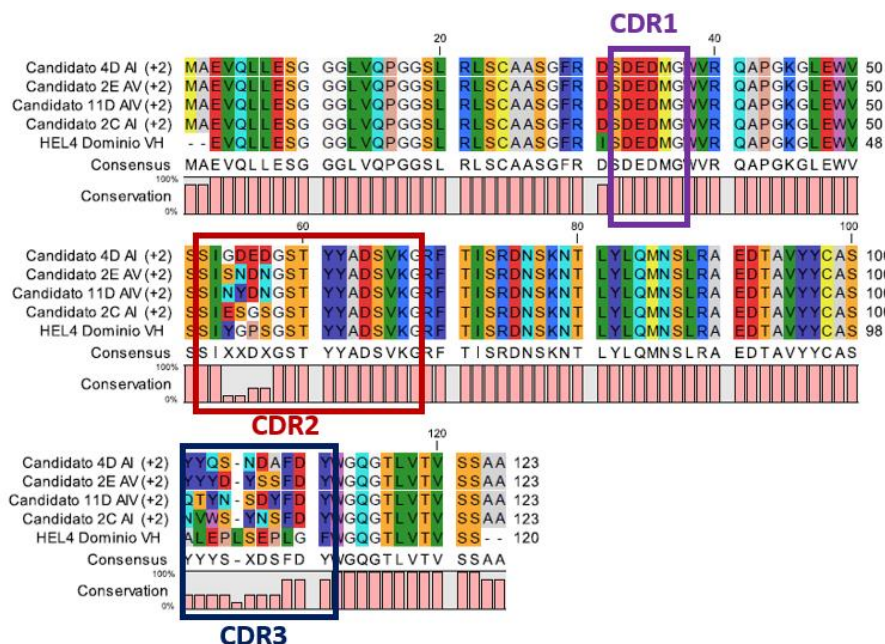


**Figura 32.** Análisis de recombinantes en pET22b(+)-sdAb por PCR. En el ensayo se obtuvieron bandas mayores a 500pb que corresponden al ADN del sdAb con sus etiquetas de c-myc y poli-histidina (flecha celeste). (A) pET22b(+)-sdAb 11DAIV. (B) pET22b(+)-sdAb 4DAI. (C) pET22b(+)-sdAb 2EAV. (D) pET22b(+)-sdAb 2CAI.

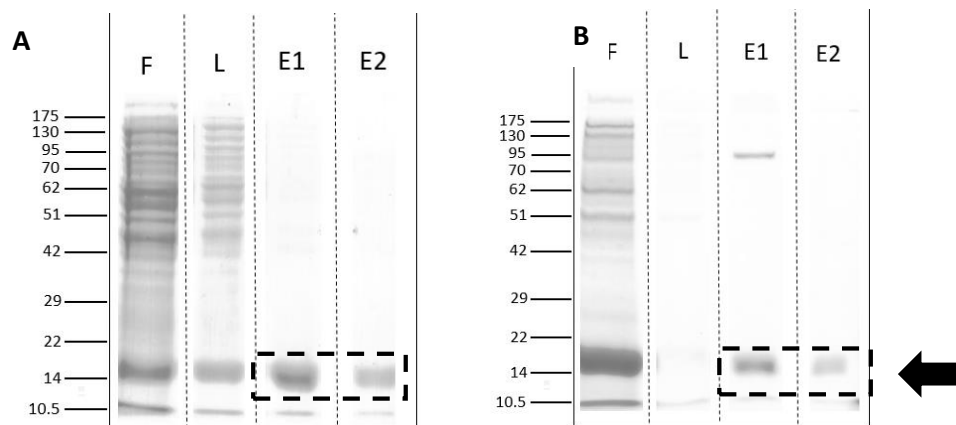
### **8.3.1.2 Caracterización y expresión de los sdAbs como péptido soluble**

El alineamiento de la secuencia de los aminoácidos de los sdAb candidatos con el sdA HEL 4 con código de acceso (GenBank: CQ761108.1) con el programa CLC Sequence viewer mostró que los candidatos no comparten la misma secuencia de aminoácidos en la región hipervariable CDR3 (Figura 33). Además, en la región CDR2 se observó una variación en 4 aminoácidos mientras que la región CDR1 reflejo una secuencia de aminoácidos similar a la del consenso sdAb HEL4.

Una vez verificados los procesos de clonamiento y diferencia en la región CDR3 en la secuenciación, en el proceso de producción y purificación se observó en los eluidos la banda del péptido de 15KDa que representó el sdAb purificado (Figura 34).



**Figura 33.** Alineamiento de las secuencias de los aminoácidos de los candidatos sdAbs 4DAI, 11DAIV, 2CAI y 2EAV contra la secuencia de aminoácidos del sdAb HEL4. Se observa la región CDR1 (línea morada), CDR2 (línea roja) y CDR3 (línea azul).



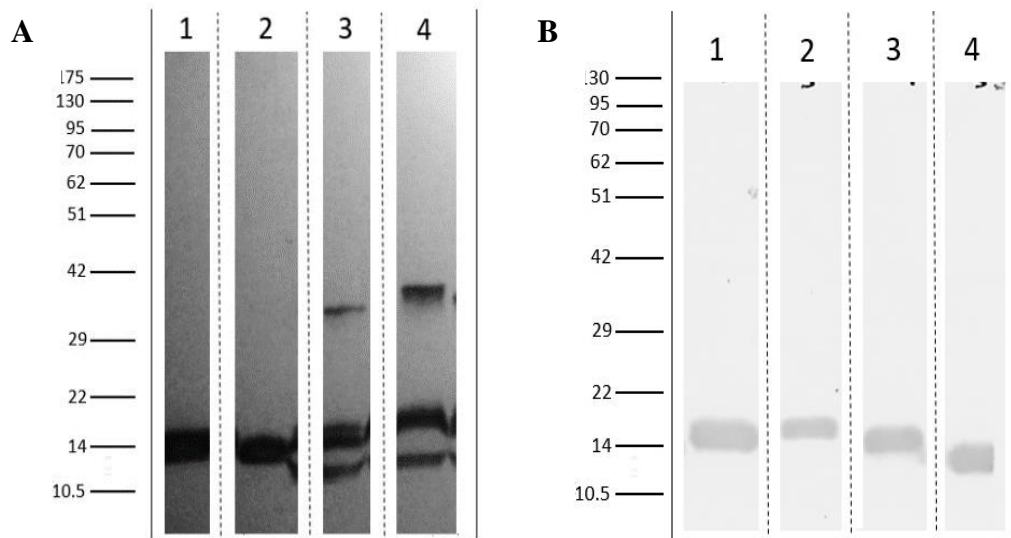
**Figura 34.** Verificación de la pureza de los sdAbs después del proceso de inducción, expresión y purificación mediante SDS PAGE al 15%. Los eluidos muestran la banda de 15KDa correspondiente al sdAb (flecha negra). (A) sdAb 11D AIV. (B) sdAb 4D AI. F: Primer flujo; L: Lavado; E1: Primer eluido; E2: Segundo eluido.

En cuanto a la producción de los sdAbs solubles, se logró obtener 1.4 a 1.9 mg de proteína purificada a partir de un cultivo de 100 mL (Tabla 10). En otros ensayos, se realizó una tercera elución durante el proceso de purificación donde no se obtuvieron cantidades detectables de sdAb soluble por lo que el proceso de purificación concluyó sólo con dos eluidos (datos no mostrados).

El ensayo de Western blot con los anticuerpos de detección penta-his y anti-cmyc demostró la presencia de la proteína recombinante de 15KDa correspondiente al sdAb-c-myc-poli-histidina, lo que indica que el proceso de purificación no afectó la integridad de cada sdAb (Figura 35).

**Tabla 10.** Producción del sdAb como proteína soluble expresado a partir de células *E. coli* BL21g transformadas con pET22b(+) ligado al sdAb y cuantificado por espectrofotometría a 280 nm en Nanodrop.

| Candidato sdAb | Producción sdAb a partir de un cultivo de 100mL<br>(mg) |                |
|----------------|---|----------------|
|                | Primer eluido   | Segundo eluido |
| sdAb 11DAIV    | 1.00  | 0.400          |
| sdAb 4DAI      | 0.923   | 0.319          |
| sdAb 2CAI      | 0.746   | 0.264          |
| sdAb 2EAV      | 1.528   | 0.388          |

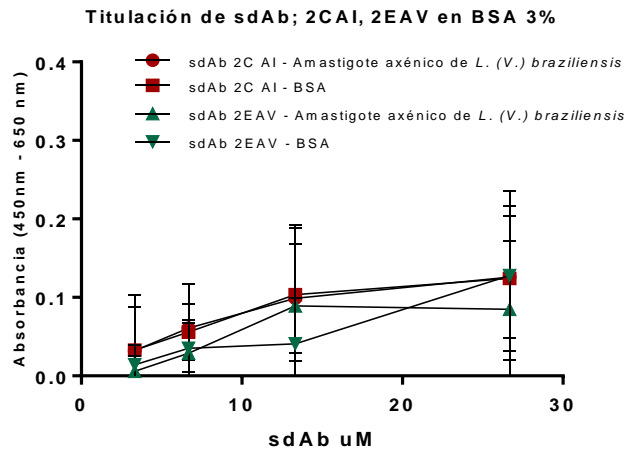
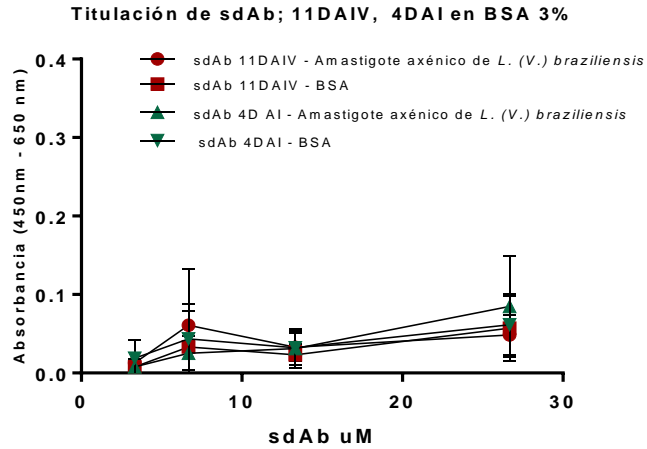


**Figura 35.** Verificación de la etiqueta de marcaje de poli-histidina y c-myc mediante el ensayo de western blot. **(A)** Marcaje de la etiqueta de poli-histidina. **(B)** Marcaje de etiqueta de c-myc. 1: sdAb 2EAV; 2: sdAb 11DAIV; 3: sdAb 4DAI; 2: sdAb 2CAI.

### **8.3.1.3 Evaluación de la unión de los sdAbs**

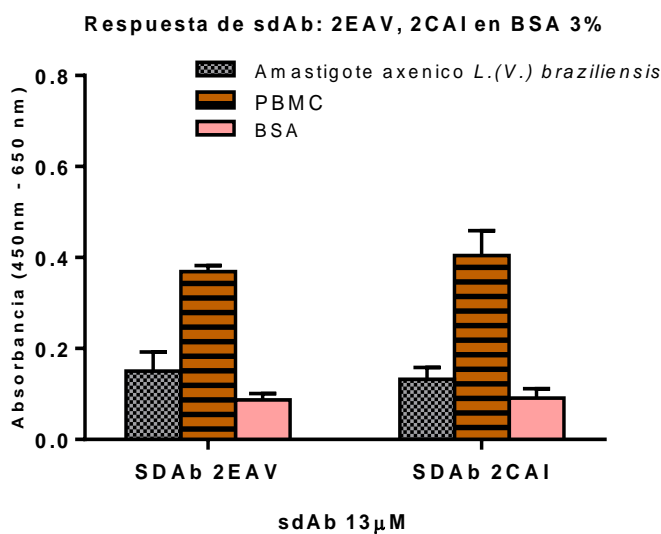
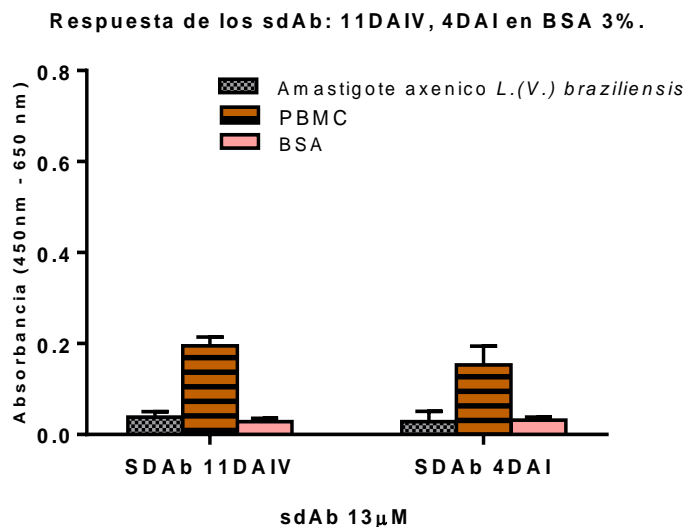
Una vez producidos los sdAbs candidatos, se pasó al análisis mediante un ensayo de ELISA en amastigotes axénicos. En el análisis de dilución de los sdAbs contra una concentración fija de  $10^6$  de amastigotes axénicos, no se evidenció una respuesta diferencial en comparación al tampón de bloqueo (BSA al 3%) (Figura 36). Lo que podría sugerir, que la señal de los sdAbs candidatos ha disminuido en el paso de ser expresado por el fago a ser péptido soluble.

En el mismo ensayo de ELISA, se evaluó la señal de los cuatro sdAbs candidatos contra PBMC para evaluar la presencia de alguna respuesta inespecífica. Este proceso se realizó, ya que en el proceso de selección no se tomó en cuenta ningún análisis contra otros complejos como PBMC (seleccionado como control negativo debido a ser un componente del sistema inmune). En dicho análisis (Figura 37), se evidenció que los 4 sdAbs reaccionaron con más intensidad contra los PBMC en comparación a la señal de los amastigotes axénicos. Además, se observó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la señal de los amastigotes axénicos y el BSA al 3% de los 4 sdAbs (sdAb 11D AIV, sdAb 4D AI, sdAb 2CAI y sdAb 2EAV). Los resultados muestran que los sdAbs candidatos analizados producen reacción inespecífica contra los PBMC.



**Figura 36.** Respuesta de la dilución seriada de los sdAbs contra los amastigotes axénicos. Los resultados exponen la absorbancia (eje y) medida por espectrofotometría de la respuesta de los cuatro sdAbs candidatos en un factor de dilución 1:2 contra  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, el eje-x muestra la dilución 1:2 del sdAb en  $\mu\text{M}$ . La unión al tampón BSA al 3% está indicado con cajas mientras la unión a las amastigotes está indicada con círculos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.





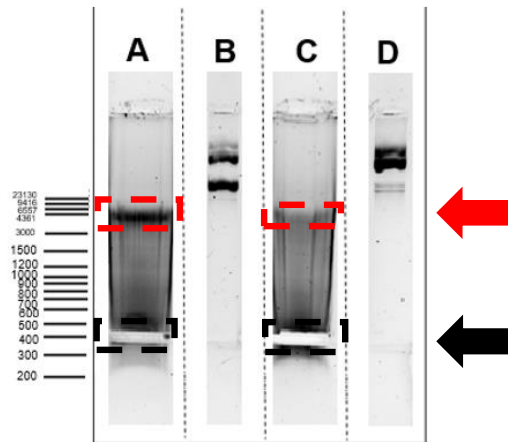
**Figura 37.** Evaluación de la respuesta de los sdAbs contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares. Las gráficas exponen la absorbancia detectada (eje y) en el ensayo de ELISA de la respuesta de los sdAbs (13μM) contra  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*,  $10^6$  PBMC y BSA al 3%, el eje-x muestra el sdAb analizado. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes.

### **8.3.2 Candidatos seleccionados por método de bio-cribado C**

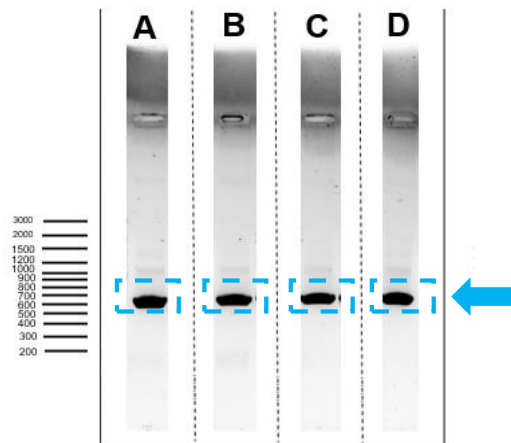
#### **8.3.2.1 Clonamiento en pET22b(+)**

Los candidatos del método de bio-cribado C fueron sub-clonados al plásmido pET22b(+). Donde el fagémido digerido resultó en un fragmento de ADN de 400 pb visualizado en el gel de agarosa al 1% (Figura 38). Por otro lado, en el proceso de transformación de células de *E. coli* XL1b con la reacción de ligación, se obtuvo un total de 679 colonias para el candidato pET22b(+)-6BIC y 598 colonias para el candidato pET22b(+)-3CIC y dos colonias en el control de ligación.

A partir de las colonias obtenidas, se realizó un ensayo de PCR a partir del ADN en 3 colonias diferentes y se obtuvo fragmentos de ADN con un tamaño por encima de 500pb que fueron revelados en agarosa al 1% (Figura 39). Las bandas de los fragmentos de ADN amplificados indicaron que el ADN del sdAb fue ligado al plásmido pET22b(+).



**Figura 38.** Digestión del ADN del fagémido de los candidatos con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* en agarosa al 1%. La flecha negra indica el fragmento de 400pb del sdAb extraído del gel para evitar daño del ADN por radiación UV. La flecha roja corresponde al fragmento de 4788 pb del fagémido. Fagémido-sdAb 6BIC digerido (A), sin digerir (B). Fagémido-sdAb 3CIC digerido (C), sin digerir (D).



**Figura 39.** Análisis de recombinantes en pET22b(+)-sdAb por PCR. En el ensayo se obtuvieron bandas mayores a 500 pb que corresponden al ADN del sdAb con sus etiquetas de c-myc y poli-histidina (flecha celeste). (A,B) pET22b(+)-sdAb 6BIC. (C, D) pET22b(+)-sdAb 3CIC.

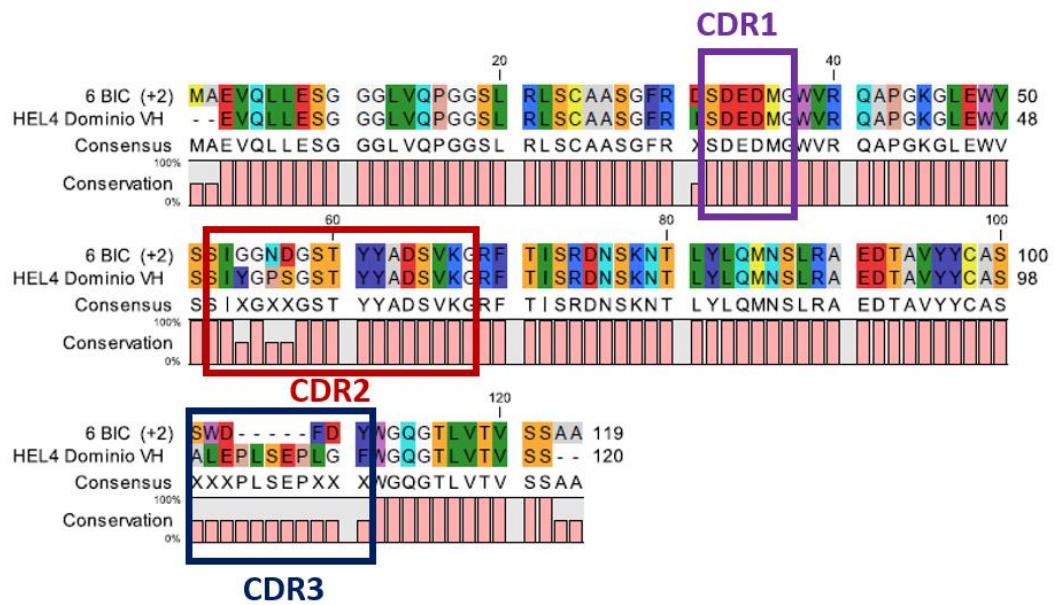
### 8.3.2.2 Caracterización y expresión de los sdAbs como péptido soluble

En el alineamiento mediante el programa CLC Sequence viewer versión 7 de los aminoácidos del candidato sdAb 6BIC contra el sdAb HEL4, se observó variación en la región CDR3 y además una variación de 4 aminoácidos de la región CDR2 (Figura 40). De igual forma que en el bio-cribado A, los eluidos obtenidos del proceso de expresión y purificación del sdAb 6BIC y 3CIC evidenciaron una banda alrededor de 15KDa en el gel de poliacrilamida al 15% (Figura 41) que coincide con el tamaño del sdAb. Además, se obtuvieron un total de 1,712 – 1.215 mg de sdAb como proteína soluble a partir de un cultivo de 100 mL (Tabla 11).

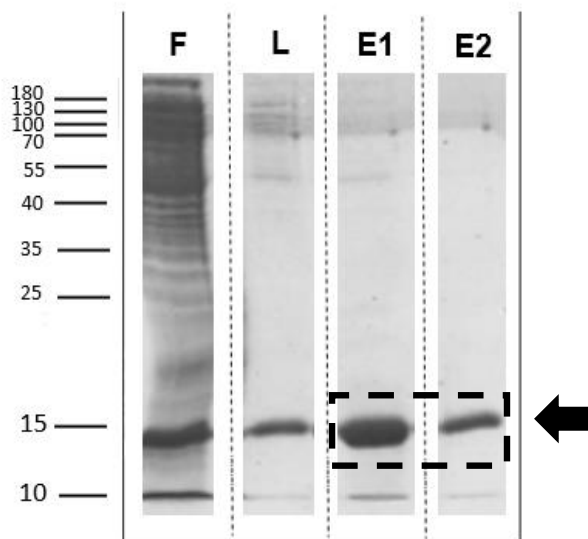
Igualmente, la etiqueta de c-myc y penta his se verificó mediante un ensayo de Western blot (Figura 42); ambos candidatos demostraron la presencia de las etiquetas analizadas.

**Tabla 11.** Producción del sdAb 6BIC y 3CIC como proteína soluble expresado a partir de células *E.coli* BL21g transformadas con pET22b(+) ligado al sdAb y cuantificado por espectrofotometría a 280 nm en Nanodrop.

| Candidato sdAb | Producción sdAb a partir de un cultivo de 100mL<br>(mg) |                |
|----------------|---|----------------|
|                | Primer eluido   | Segundo eluido |
| sdAb 6BIC      | 1.12 mg   | 0.592 mg       |
| sdAb 3CIC      | 0.847 mg  | 0.368 mg       |

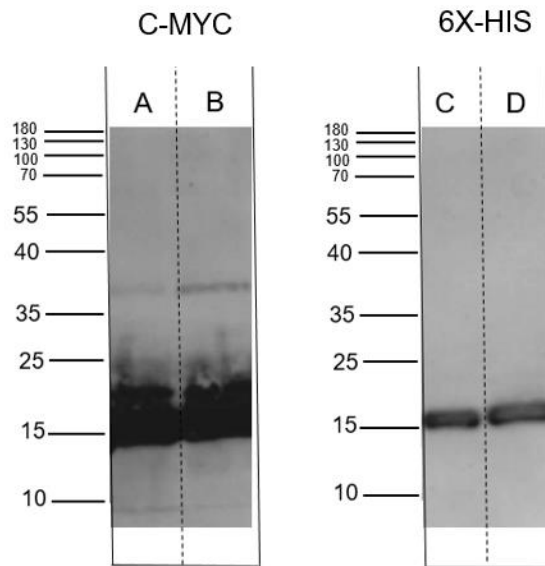


**Figura 40.** Alineamiento de las secuencias de los aminoácidos del candidato sdAb 6BIC contra la secuencia de aminoácidos del sdAb HEL4 con el programa CLC Sequence viewer. Se observa la región CDR1 (línea morada), CDR2 (línea roja) y CDR3 (línea azul).



**Figura 41.** Verificación de la pureza del sdAb 6B IC después del proceso de inducción, expresión y purificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. Los

eluidos muestran la banda de 15KDa correspondiente al sdAb (flecha negra). F: Primer flujo; L: Lavado; E1: Primer eluido; E2: Segundo eluido.

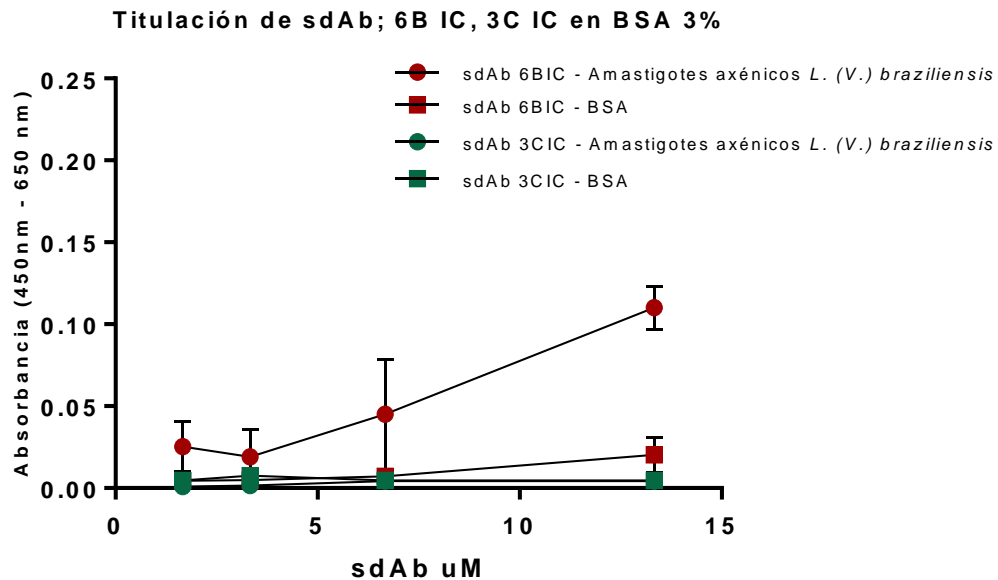


**Figura 42.** Verificación de la etiqueta de marcaje de poli-histidina y c-myc mediante el ensayo de western blot en los sdAbs. **(A)** Marcaje de la etiqueta de c-myc del sdAb 6BIC. **(B)** Marcaje de la etiqueta de c-myc del sdAb 3CIC. **(C)** Marcaje de la etiqueta de poli-histidina del sdAb 6BIC. **(D)** Marcaje de etiqueta de poli-histidina del sdAb 3CIC.

### 8.3.2.3 Evaluación de la unión de los sdAbs

Una vez ya expresado el candidato sdAb 6BIC así como el sdAb 3CIC, se procedió al análisis de la respuesta con diferentes concentraciones del sdAb. En el cual se reveló que sólo el sdAb 6BIC muestra una señal diferencial contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* en comparación al tampón de bloqueo a una concentración de 13  $\mu$ M (Figura 43).

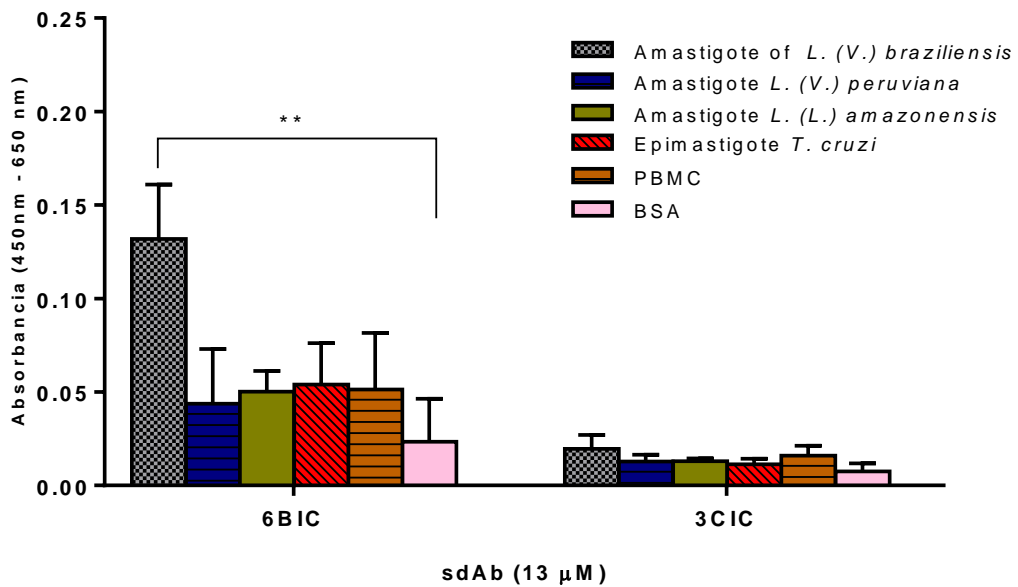
Con el fin de analizar si la respuesta del candidato sdAb 6BIC es específica, se procedió a realizar un ensayo de ELISA contra otros complejos celulares. En la Figura 44, se evidenció que sólo hay diferencia estadísticamente significativa en la señal del sdAb contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* en comparación al BSA al 3% (Tabla 12), mientras que no hay diferencia estadísticamente significativa contra los demás complejos celulares como epimastigotes de *T. cruzi* y PBMC (Tabla 12). De la misma forma la respuesta del sdAb 6BIC contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis* no reflejó una diferencia estadísticamente significativa en comparación al BSA al 3% o los complejos celulares. Por otro lado, el candidato sdAb 3CIC, no mostró diferencia estadísticamente significativa en comparación a todos los complejos analizados incluidos BSA al 3%.



**Figura 43.** Evaluación de la respuesta de la dilución seriada de los sdAbs contra amastigotes axénicos. En la gráfica, se observa la absorbancia (eje y) medida por espectrofotometría mediante un ensayo de ELISA de la respuesta de la dilución 1:2 de los sdAbs 6BIC y 3CIC contra  $10^6$  amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, el eje-x muestra dilución en un factor de 1:2 de los sdAbs. Las barras de error indican la desviación estándar de dos experimentos independientes.



#### Respuesta de los sdAb contra amastigotes y otros complejos celulares



**Figura 44.** Evaluación de la respuesta de los sdAb 6BIC y 3CIC frente a amastigotes axénicos y otros complejos celulares mediante un ensayo de ELISA. El eje y, muestra la absorbancia de la reacción de los sdAbs (13 μM) contra  $10^6$  amastigotes axénicos,  $10^6$  epimastigotes de *T. cruzi* y  $5 \times 10^5$  PBMC y el eje-x muestra el candidato sdAb analizado. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes (\*\* $P \leq 0,01$ ).

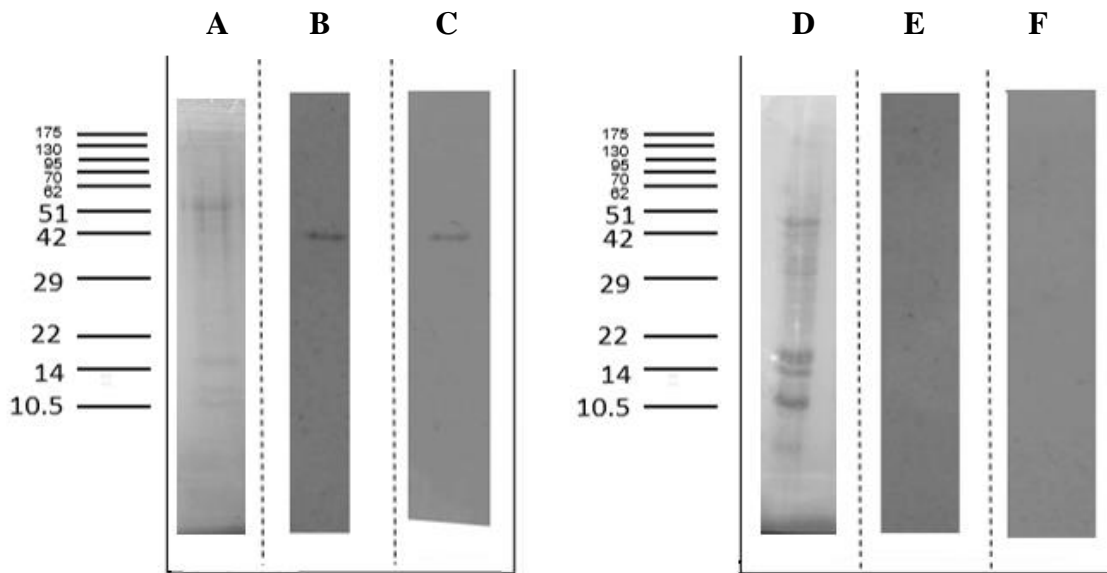
**Tabla 12.** Análisis de varianza para un factor del candidato sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares.

| <b>Grupo</b>         | <b>Grados de Libertad</b> | <b>Suma de Cuadrados</b> | <b>Cuadrado de medias</b> | <b>F</b> | <b>p</b> |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|----------|
| <b>Entre grupos</b>  | 5                         | 0,0209                   | 0,0042                    | 6,7      | 0,0034   |
| <b>Dentro grupos</b> | 12                        | 0,0075                   | 0, 0006                   |          |          |
| <b>Total</b>         | 17                        | 0,285                    | 0,0017                    |          |          |

**Cuadro de comparación de Scheffe valores de p**

|                       | <b>Amastigotes Axénicos <i>L. braziliensis</i></b> | <b>Amastigotes Axénicos <i>L. peruviana</i></b> | <b>Amastigotes Axénicos <i>L. amazonensis</i></b> |
|-----------------------|--|---|---|
| <b><i>T.cruzi</i></b> | 0, 060   | 0,998   | 1,000   |
| <b>PBMC</b>           | 0, 050   | 1,000   | 1,000   |
| <b>BSA</b>            | 0,007  | 0,958   | 0,877   |

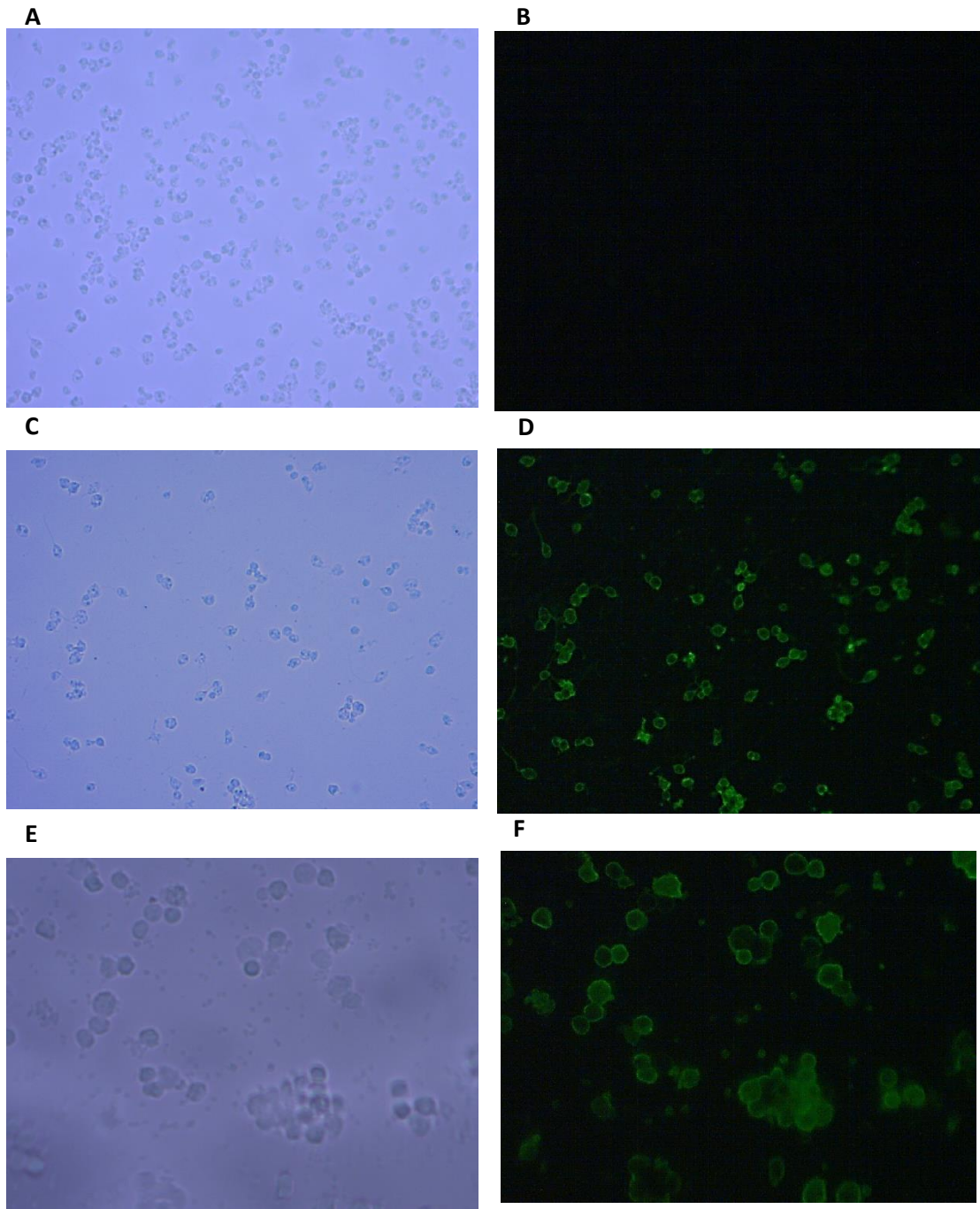
El ensayo de western blot contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y PBMC, se realizó para determinar el tamaño de la proteína reconocida por el candidato sdAb 6BIC. En dicho experimento, después de realizar la transferencia se observó la presencia de bandas con tamaños entre 130-10,5 KDa con la coloración de ponceau (Figura 45, A y D). Sin embargo, al realizar el ensayo de Western blot no hubo ninguna reacción del sdAb 6BIC con los lisados de PBMC; así como el control de reacción del anticuerpo de detección anti-c-myc contra los PBMC (Figura 45, E y F). En el caso de la respuesta del sdAb contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, se observó una banda de reacción alrededor de 42 kDa; sin embargo, la banda también fue visualizada en el control de reacción del anticuerpo secundario anti-c-myc contra los amastigotes axénicos (Figura 45, B y C).



**Figura 45.** Evaluación de la respuesta del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y otros complejos celulares mediante Western blot. **(A)** Lisado de amastigote axénico teñido con rojo de ponceau ( $5 \times 10^6$  células). **(B)** Reacción del sdAb 6BIC contra lisado de amastigote axénico. **(C)** Reacción del anti-c-myc contra lisado de amastigote axénico (control de reacción). **(D)** Lisado de PBMC teñido con rojo de ponceau ( $5 \times 10^5$  células). **(E)** Reacción del sdAb 6BIC contra lisado de PBMC. **(F)** Reacción del anti-c-myc contra lisado de PBMC (control de reacción).

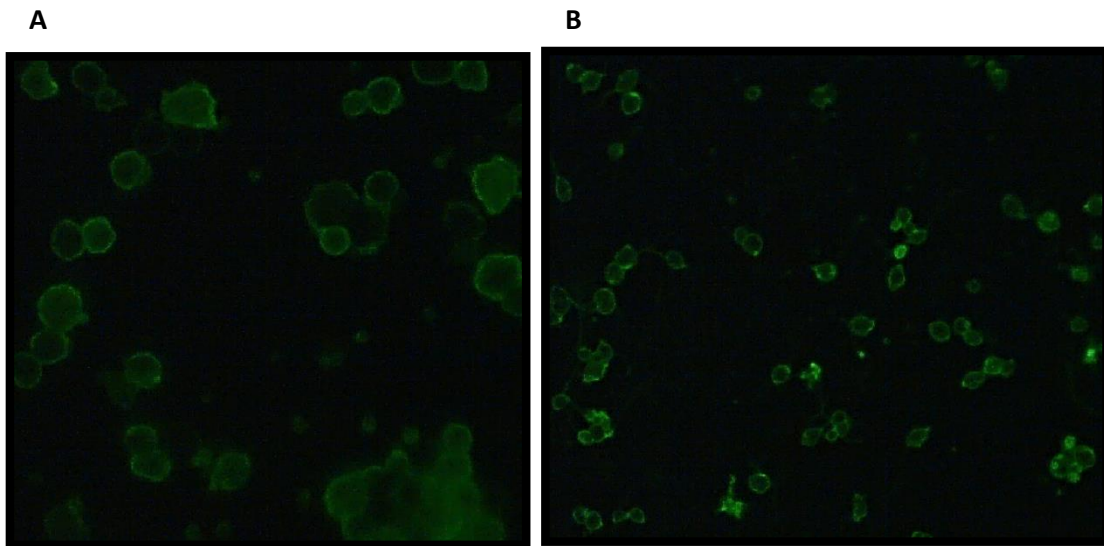
Por último, se analizaron las células de los amastigotes axénicos, y PBMC mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. En el cual, la señal contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* fue más intensa con un patrón granulado en la superficie de la membrana del parásito. Mientras que en el caso de los PBMC también se observó respuesta, aunque leve y de forma difusa (Figura 46, 47).

En el análisis contra los amastigotes de oreja de ratón infectado, no se muestran los resultados ya que la detección por el anticuerpo proteína A-alexa 488 generó una gran respuesta inespecífica contra el debris celular evitando así la detección de los parásitos por la señal de fondo generada.



**Figura 46.** Evaluación de la respuesta del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos y PBMC por inmunofluorescencia. Las imágenes evidencian la respuesta del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y PBMC mediante la proteína A-

alexa 488 en un microscopio de fluorescencia. (A) Control de reacción con microscopia de luz (B) Control de reacción con microscopia de fluorescencia. (C) Amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* con microscopia de luz (D) Amastigotes axénicos *L. (V.) braziliensis* detectado con sdAb 6BIC en microscopia de fluorescencia. (E) PBMC con microscopia de luz. (F) PBMC detectados con sdAb 6BIC con microscopia de fluorescencia, 40x.



**Figura 47.** Patrón diferencial de señal del sdAb 6BIC contra amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y PBMC mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta detectada por proteína A-alexa 488. (A) PBMC (B) Amastigote axénicos de *L. (V.) braziliensis*, 40x.

## **8.4 Análisis contra amastigotes extraídos de oreja de ratón infectados**

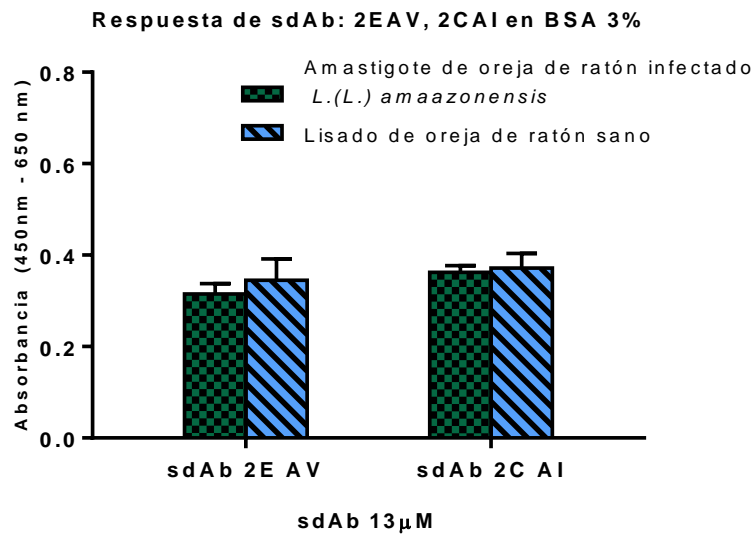
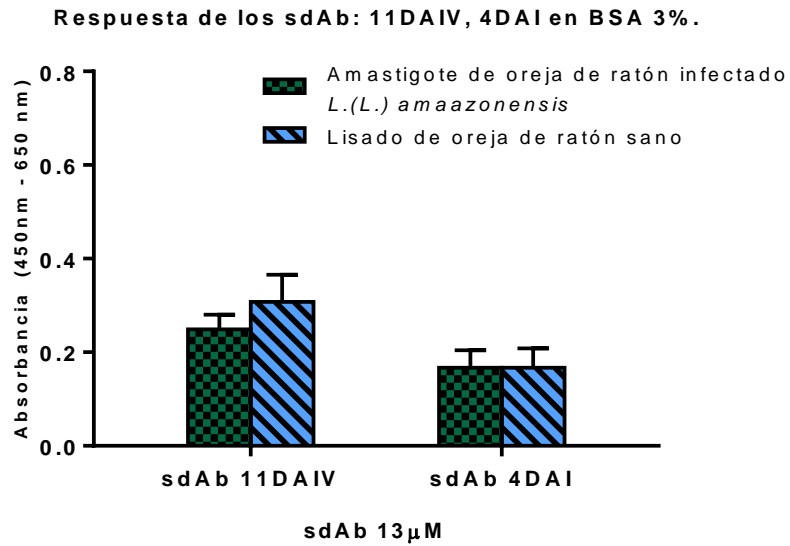
### **8.4.1 Análisis de los candidatos resultantes del método de bio-cribado A y B**

A pesar de que los cuatro candidatos obtenidos mostraron una reacción inespecífica contra PBMC, se procedió al análisis contra los amastigotes de oreja de ratón infectado, ya que se sabe que el perfil proteico entre amastigotes axénicos y extraídos de infección en ratón es diferente, lo que podría brindar resultados distintos. En el ensayo de ELISA realizado (Figura 48), se observó respuesta de los cuatro sdAb candidatos contra  $1 \times 10^5$  amastigotes de oreja de ratón infectado, sin embargo, dicha respuesta no presentó una diferencia estadísticamente significativa contra los lisados de oreja de ratón sano.

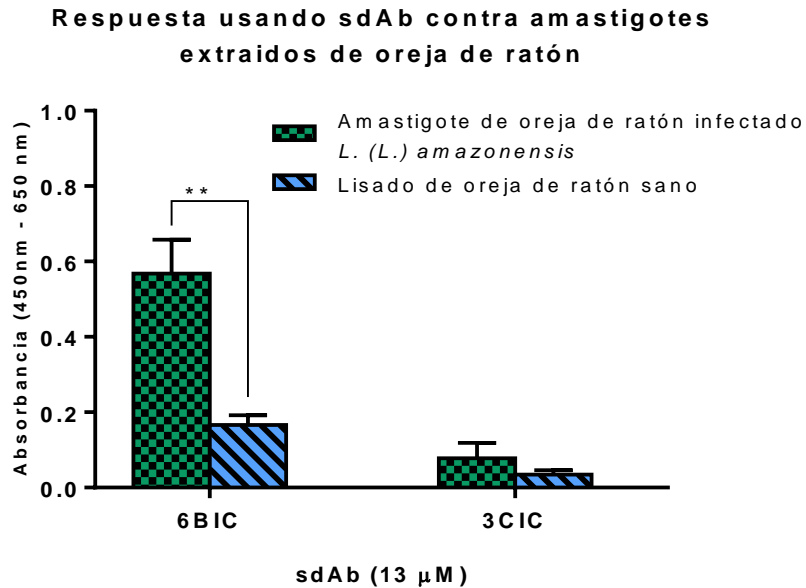
### **8.4.2 Análisis de los candidatos resultantes del método de bio-cribado C**

Ya que en los ensayos de fago-ELISA, se observó respuesta positiva del candidato sdAb 6BIC contra amastigotes de oreja de ratón infectado, se pasó a realizar dicho análisis contra el candidato en su forma de sdAb soluble. En el ensayo de ELISA realizado, se evidenció una mayor respuesta contra los amastigotes de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis* en comparación a su control negativo de lisado de oreja de ratón sano (Figura 49). Del análisis estadístico, se determinó que dicha diferencia es estadísticamente significativa (Tabla 13), lo que indicó que el candidato sdAb 6BIC podría ser una posible herramienta biotecnológica en el reconocimiento de amastigotes de *Leishmania*.





**Figura 48.** Análisis de los sdAbs 11DAIV, 4DAI, 2EAV y 2CAI contra amastigotes de orejas de ratón infectado. En un ensayo de ELISA, se evaluó la respuesta de los sdAbs (13µM) contra  $10^5$  amastigotes de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis* y lisado de oreja de ratón sano. El eje-y representa los valores absorbancia y el eje-x muestra el sdAb. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes.



**Figura 49.** Análisis de los sdAbs 6BIC y 3CIC contra amastigotes extraídos de oreja de ratón. Los resultados en la gráfica corresponden a la absorbancia (eje y) medida por espectrofotometría del sdAb 6BIC y 3CIC (13  $\mu$ M) contra  $10^5$  de amastigotes extraídos de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis* y su control de lisado de oreja de ratón sano mediante un ensayo de ELISA, el eje-x muestra el candidato sdAb analizado. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes (\*\* $P \leq 0.01$ ).

**Tabla 13.** Análisis estadístico de T-student del sdAb 6BIC contra amastigotes extraídos de oreja infectada contra lisado de oreja de ratón sano.

| <b>Grupo</b>           | <b>Media</b> | <b>Error Estándar</b> | <b>Desviación Estándar</b> | <b>(95% Conf. Interval)</b> |       | <b>t</b> | <b>P</b> |
|------------------------|--------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|----------|----------|
|                        |              |                       |                            |                             |       |          |          |
| <b>Oreja infectada</b> | 0,568        | 0,052                 | 0,0905                     | 0,343                       | 0,793 | 7,38     | 0.001    |
| <b>Oreja Sana</b>      | 0,167        | 0,015                 | 0,0255                     | 0,103                       | 0,230 |          |          |

## IX. Discusión

El presente proyecto de investigación emplea la tecnología PD en la primera identificación de *novo* de un sdAb denominado como 6BIC contra células enteras del estadio amastigote de *Leishmania*. Hay muchos reportes de la aplicación de esta tecnología como herramientas de diagnóstico, con prometedores resultados en la detección de biomarcadores de cáncer (Audenhove *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016), antígenos de cisticercosis (Deckers *et al.*, 2009) entre otros. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes donde se hayan identificado sdAb con capacidad de detección de antígenos de *Leishmania*. Por el contrario, existen reportes que se enfocan en la detección de anticuerpos (método de diagnóstico no factible en los CAP), mediante el uso de biblioteca de péptidos para el diagnóstico de LC y LMC (Costa *et al.*, 2016); y LV (Costa *et al.*, 2014; Toledo-machado *et al.*, 2015), reportando sólo el uso del péptido expresado en un fago y no como proteína soluble. Incluso en otros tripanosomátidos como el género de *Trypanosoma*, se ha reportado un sdAb con potencial de diagnóstico (Obishakin *et al.*, 2014). De manera similar que en leishmaniasis, los estudios se enfocan más en la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma* mediante el uso de librerías de péptidos (Balharbi *et al.*, 2012; Van Nieuwenhove *et al.*, 2011). Por lo que este trabajo es de particular interés, ya que se centra en la búsqueda de sdAb con capacidad de detección de antígenos de superficie de amastigotes de *Leishmania* al trabajar con células enteras del estadio amastigote.

En el presente proyecto de investigación, se planteó como blanco de estudio a los antígenos de superficie del estadio amastigote de *Leishmania*, ya que pueden brindar

blancos no del todo explorados que al estar presentes en la membrana del parásito no pueden ser fácilmente estudiados. La dificultad en el estudio de antígenos de membrana es debido a que los métodos de purificación de las proteínas de superficie pueden generar la pérdida de la estructura cuaternaria así como sus propiedades de unión dependiendo del método y detergente utilizado en la purificación (Lin *et al.*, 2009). Por lo que para la investigación, se emplearon las células enteras con el fin de mantener la estructura nativa de los componentes de la membrana celular; tal como se realizó en otros organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* (Bishop-hurley *et al.*, 2010; Carnazza *et al.*, 2008; Paoli *et al.*, 2004; Pini *et al.*, 2005; Sorokulova *et al.*, 2005). A nivel de *Leishmania*, dicho enfoque de estudio (empleando células enteras) sólo ha sido reportado por Rhaïem *et al.*,(2016).

Las células enteras para la investigación, se obtuvieron a partir de dos fuentes: una “*in vitro*” y otra “*in vivo*”. La transformación *in vitro* de promastigote-amastigote axénico fue mayor al 95%, con la presencia de formas ovals o redondas no móviles entre el 3<sup>er</sup> - 4<sup>to</sup> día para las tres especies de *Leishmania* utilizadas (*L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis*), resultados comparables con los reportados por González *et al.*, (2009) y Texeira *et al.*, (2002). Además, los amastigotes axénicos empleados en este estudio mostraron un tamaño celular mayor en comparación a las formas extraídas de orejas infectadas de ratón obtenidas, dicha característica fue reportada por Pescher *et al.*(2011).

Por otro lado, en la obtención “*in vivo*”, el progreso de las lesiones en el modelo animal

son concordantes con las reportadas por Carvalho *et al.*, (2012); Farrell, (2002); en donde las infecciones en oreja de ratón con *L. (L.) amazonensis* muestran un avance progresivo entre la semana 8 -10 post infección (Carvalho *et al.*, 2012; Farrell, 2002) momento en el cual se les realizó la eutanasia. Ya que se ha reportado de acuerdo a infecciones en ratones BALB/c con la especie *L. (L.) amazonensis* que en la 8<sup>va</sup> semana de infección presentan un mayor número de macrófagos infectados con pocas células polimorfo nucleares (Carvalho *et al.*, 2012), lo cual favoreció el proceso de purificación de los amastigotes.

Con las células de amastigotes axénicos ya determinadas, se desarrollaron tres metodologías diferentes de bio-cribado denominados como A, B y C; además los métodos A y B se realizaron por fijación en placa mientras que el método C por suspensión. En el método de bio-cribado A, se obtuvieron cuatro sdAbs candidatos que no mostraron respuesta contra amastigotes axénicos; pero sí reacción cruzada contra otras células como PBMC y lisado de oreja de ratón sano. En consecuencia, los candidatos se consideraron inespecíficos, lo que coincide con lo previamente reportado por Huang (2012), quien menciona que estudios con células enteras difieren con los realizados con proteínas recombinantes o nativas, debido a que las superficies celulares comparten un alto grado de similaridad (Huang *et al.*, 2012). Por tanto, el bio-cribado A condujo a la obtención de candidatos inespecíficos, por lo que, se postuló la inclusión de métodos de selección negativa o sustractiva que progresivamente irían removiendo los fagos-sdAbs inespecíficos por lo que se implementó el método de bio-cribado B.

A pesar que con el método de bio-cribado B se aumentó la rigurosidad de selección se

obtuvo un candidato inespecífico, lo que indica que este proceso de bio-cribado tampoco es el óptimo. Ya que como reporta Hoogenboom *et al.* (1999), la eficiencia de la selección en las estructuras superficiales depende de la estructura y naturaleza del blanco. El estudio de Hoogenboom (1999), se realizó empleando células CHO que expresaban uno de los receptores transmembrana (7-TM) para somatostatina, no seleccionando candidato alguno adecuado, a pesar de la inclusión de selecciones negativas. Sin embargo, en células con la glicoproteína transmembrana CD36; un sólo proceso de selección positiva condujo a la obtención de anticuerpos específicos.

Por otro lado, Menendez (2005), consideró que el método de bio-cribado realizado por método de fijación en placa presenta muchos factores que afectan el rendimiento de la selección llevando a la obtención de fagos de unión inespecífico, presentes en abundancia después de los proceso de elución. Entre los factores se tiene: la unión inespecífica al tampón de bloqueo y a la fase sólida plásticas de las placas (Adey *et al.*, 1995; Menendez *et al.*, 2005; Rebeski *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Además existen ciertos fagos que expresan péptidos de una particular composición de aminoácidos (como es el motivo WXXW) que son capaces de unirse al plástico soportando los ciclos de lavado y recuperándose durante la elución (Adey *et al.*, 1995).

Tomando en cuenta lo anterior, se propuso un proceso de bio-cribado C. A diferencia de los dos métodos de bio- cribado (A y B), en este método los procesos de lavado y elución se realizaron mediante centrifugaciones evitando obtener candidatos afines a la fase sólida y además se incluyó el proceso de amplificación que implica inducir la producción de fagos de los clones obtenidos para realizar nuevas selecciones, el cual

no fue considerado en los dos métodos anteriores.

El proceso de amplificación no fue considerado en los métodos anteriores porque se ha reportado que la amplificación puede ser perjudicial en los blancos de estudio con múltiples sitios de unión (células, tejidos y otros) y puede generar la disminución de la diversidad de la biblioteca hasta un 70% (Derda *et al.*, 2011), lo que llevó a la decisión de considerar un sólo paso de amplificación en el proceso de bio- cribado C.

El candidato sdAb 6BIC del bio-cribado C, evidenció una leve respuesta contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* cuya diferencia fue estadísticamente significativa contra BSA, a pesar de mostrar alta respuesta en el análisis con el sdAb expresado por el fago. En cambio, se mantiene una baja respuesta contra amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis* y no se observa diferencia estadísticamente significativa en comparación a la respuesta del tampón de bloqueo y los controles negativos (*T.cruzi* y PBMC). La disminución en la respuesta en el paso de fago-sdAb a sdAb soluble contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* es comparable a lo reportado por Rhaiem *et al.*(2016); que observó hasta un 80% de pérdida en la respuesta del péptido y sugiere que hay un cambio de conformación en el péptido cuando éste pasa de estar expresado por el fago a ser producido como proteína soluble.

Por otro lado, en los análisis mediante ensayos de ELISA, se evidenció que la respuesta del sdAb 6BIC contra los amastigotes de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis* presenta una diferencia estadísticamente significativa en comparación al control negativo de lisado de oreja de ratón sano. La diferencia en la respuesta entre



los amastigotes axénicos y amastigotes de oreja infectada de ratón, se podría deber a que el blanco reconocido por el sdAb 6BIC esté presente en mayor abundancia en los amastigotes de oreja de ratón infectado, facilitando su reconocimiento. Ya que, existen evidencias científicas que demuestran una diferencia en el perfil de expresión de transcritos entre amastigotes axénicos y amastigotes extraídos de lesión en ratón o línea celular, mostrando que ambos sólo comparten un 12% de los transcritos sobreexpresados (Holzer *et al.*, 2006; Rochette *et al.*, 2009). Por lo que, si bien al amastigote axénico permite facilidades de manejo en laboratorio; cuenta con diferencias del tipo fisiológica, bioquímica y molecularmente en comparación al amastigote extraído de lesión del modelo “*in vivo*” o línea celular.

Por último, en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, el sdAb 6BIC presenta una respuesta positiva frente a los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* con un patrón granulado en la superficie de membrana. Mientras que en el caso de PBMC, también se presenta una respuesta pero de condición leve y difusa. Estos resultados difieren a los obtenidos en el ensayo de ELISA ya mencionados. Dicho evento de variación entre los ensayos es comparable a lo reportado por Obishakin, (2014), cuyo sdAb seleccionado evidenció respuesta diferencial en los ensayos de ELISA en comparación al ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra 5 especies de *T. cruzi*; lo que sugiere que el ensayo de inmunofluorescencia es más sensible que el de ELISA ya que las células están fijadas y más expuestas. En el ensayo de Western blot, no se observó ninguna banda de reacción del sdAb contra los amastigotes axénicos. Lo que sugirió, que el epítipo reconocido por el sdAb es del tipo conformacional y que al ser

denaturado en el proceso de electroforesis generó su forma lineal que ya no es reconocida.

Por lo tanto, el presente proyecto de investigación identifica un anticuerpo de dominio único, denominado sdAb 6BIC, como potencial herramienta de diagnóstico en la detección de amastigotes. Este anticuerpo podría ser adaptado a un sistema de detección por microscopia de luz, mediante la conjugación con biotina u oro coloidal. No obstante, la reacción observada contra PBMC en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta es una limitante que podría ser superada realizando ensayos de mutagénesis dirigida en el sdAb y así disminuir la respuesta contra los PBMC. Cabe mencionar que dicha respuesta de fluorescencia en los PBMC es menor en comparación con la observada con los amastigotes axénicos.

La identificación de este sdAb abre las puertas a nuevos enfoques con herramientas modernas para la optimización del diagnóstico convencional para la leishmaniasis.

## X. Conclusiones

- El candidato sdAb 6BIC generado a partir de una clona de fago-sdAb presente en una biblioteca sintética de sdAb de origen humano no inmunizado PREDATOR, es afín a amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y amastigotes extraídos de oreja de ratón BALB/c infectado con *L. (L.) amazonensis*.
- El método con mayor rendimiento de selección fue el bio-cribado C con el método de suspensión con amplificación.
- En el caso de la evaluación de amastigotes axénicos, el candidato sdAb 6BIC en el ensayo de ELISA evidenció respuesta contra los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis*, no obstante, no mostró respuesta contra amastigotes axénicos de *L. (V.) peruviana* y *L. (L.) amazonensis* así como epimastigotes de *T. cruzi* y PBMC. A diferencia del ensayo de inmunofluorescencia indirecta donde se observó señal en los amastigotes axénicos de *L. (V.) braziliensis* y PBMC aunque la señal es menor en el último.
- En el caso de la evaluación de los amastigotes de oreja de ratón infectado con *L. (L.) amazonensis*, el ensayo de ELISA mostró que el candidato sdAb 6BIC presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación a un lisado de oreja de ratón sano.

## XI. Recomendaciones

- Mejorar el sistema de detección mediante marcaje con biotina.
- Evaluar la respuesta del sdAb 6BIC contra amastigotes extraídos de oreja de ratón infectado con *L. (V.) braziliensis*.
- Determinar el antígeno detectado por el sdAb 6BIC.
- Realizar ensayos de mutagénesis dirigida para mejorar la afinidad de unión del sdAb y los amastigotes de *Leishmania*.

## XII.Referencias Bibliográficas

Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Pillai, S. (2012). *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Health Sciences (Vol. 7). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>.

Adey, N. B., Mataragnon, A. H., Rider, J. E., Carter, J. M., & Kay, B. K. (1995). Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene*, 156(1), 27–31. [http://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00058-E](http://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00058-E)

Allahverdiyev, A. M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., & Memisoglu, H. R. (2004). A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(3), 294–297.

Almeida, R. P., Barral-netto, M., Jesus, A. M., Freitas, L. A., Carvalho Filho, E. M., & Barral, A. M. (1996). Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. Retrieved from <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7612>

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., & Cano, J. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PloS One*, 7(5), e35671. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

Andresen, K., Gaafar, A., El-Hassan, A. M., Ismail, A., Dafalla, M., Theander, T. G., & Kharazmi, A. (1996). Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct

microscopy of smears and sections from lesions. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 133–135. [http://doi.org/10.1016/S0035-9203\(96\)90112-1](http://doi.org/10.1016/S0035-9203(96)90112-1)

Anthony, R. L., Grogl, M., Sacci, J. B., & Ballout, R. W. (1987). Rapid detection of *Leishmania amastigotes* in fluid aspirates and biopsies of human tissues. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(2), 271–276.

Arbabi-ghahroudi, M., Tanha, J., & Mackenzie, R. (2005). Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24(4), 501–519. <http://doi.org/10.1007/s10555-005-6193-1>

Arevalo, J., Ramirez, L., Adai, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., ... Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 195(12), 1846–1851. <http://doi.org/https://doi.org/10.1086/518041>

Audenhove, I. Van, & Gettemans, J. (2016). EBioMedicine Nanobodies as Versatile Tools to Understand , Diagnose , Visualize and Treat Cancer. *EBIOM*, 8, 40–48. <http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.028>

Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F. P., & Harris, E. (1999). PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnosis methods, 85(2), 181–187. <http://doi.org/10.2307/3285616>

Bahara, N. H., Tye, G. J., Choong, Y. S., Ong, E. B., & Ismail, A. (2013). Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals*, *41*(4), 209–216. <http://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.04.001>

Bahr, V., Stierhof, Y., Ilg, T., Demar, M., Quinten, M., & Overath, P. (1993). Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *58*(1), 107–121. [http://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90095-F](http://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90095-F)

Balharbi, F., Humbert, M., Dieltjens, T., Nieuwenhove, L. Van, Bu, P., Guisez, Y., & Lejon, V. (2012). Identification of Mimotopes with Diagnostic Potential for *Trypanosoma brucei gambiense* Variant Surface Glycoproteins Using Human Antibody Fractions. *PloS Negl Trop Dis*, *6*(6), e1682. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001682>

Barroso-freitas, A. P., Passos, S. R., Mouta-confort, E., Marzochi, M. C., & Marzochi, K. B. (2009). Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *103*(4), 383–389. <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.019>

Bates, P. A. (1993). Axenic Culture of *Leishmania* Amastigotes. *Parasitology Today*, *9*(4), 143–146. [http://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90181-E](http://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90181-E)

Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of*

*Clinical Microbiology*, 44(4), 1435–1439. <http://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435>

Bishop-hurley, S. L., Rea, P. J., & Mcsweeney, C. S. (2010). Phage-displayed peptides selected for binding to *Campylobacter jejuni* are antimicrobial. *Protein Engineering Design and Selection*, (gzq050), 1–7. <http://doi.org/10.1093/protein/gzq050>

Carnazza, S., Foti, C., Gioffr, G., Felici, F., & Guglielmino, S. (2008). Specific and selective probes for *Pseudomonas aeruginosa* from phage-displayed random peptide libraries. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 1137–1144. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2007.11.001>

Carvalho, A. K., Silveira, F. T., Passero, L. F., Gomes, C. M., Corbett, C. E., & Laurenti, M. D. (2012). *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunology*, 34(8–9), 395–403. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01370.x>

Castel, G., Chtéoui, M., Heyd, B., & Tordo, N. (2011). Phage Display of Combinatorial Peptide Libraries: Application to Antiviral Research. *Molecules*, 16(5), 3499–3518. <http://doi.org/10.3390/molecules16053499>

Cataldo, J. I., de Queiroz Mello, F. C., Mouta-Confort, E., de Fátima Madeira, M., de Oliveira Schubach, A., da Silva Genestra, M., & Passos, S. R. (2010). Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Using Soluble and Membrane-Enriched Fractions from Infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 24(5), 289–294.



<http://doi.org/10.1002/jcla.20402>

Celeste, B. J., Carmen, M., Sanchez, A., Ramos-sanchez, E. M., Castro, L. G. M., Assis, F., ... Goto, H. (2014). Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous , Mucosal , and Visceral Leishmaniases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5), 860–865. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0623>

Centro Nacional de Epidemiología. Prevención y control de Enfermedades [DGE-MINSA]. (2016). Reporte de la semana epidemiológica 50, 2016. Retrieved from <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/tablas/2016/50.pdf>

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Salud Pública [DGE-MINSA]. (2015). Situación epidemiológica de la leishmaniasis en el Perú, I semestre 2015 (SE 26), 26(24), 517–520.

Chan, C. E., Zhao, B. Z., Cazenave-gassiot, A., Pang, S., Bendt, A. K., Wenk, M. R., ... Hanson, B. J. (2013). Novel phage display-derived mycolic acid-specific antibodies with potential for tuberculosis diagnosis. *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2924–2932. <http://doi.org/10.1194/jlr.D036137>

Chan, C., Lim, A. P., Macary, P. A., & Hanson, B. J. (2014). The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *International Immunology*, 26(12), 649–657. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxu082>

Chen, J., He, Q., Xu, Y., Fu, J., Li, Y., & Tu, Z. (2016). Nanobody medicated

immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Talanta*, 147, 523–530. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.027>

Costa, L. E., Goulart, L. R., de Jesus Pereira, N. C., Lima, M. I. S., Duarte, M. C., Martins, V. T., ... Coelho, E. A. F. (2014). Mimotope-Based Vaccines of *Leishmania infantum* Antigens and Their Protective Efficacy against Visceral Leishmaniasis. *PloS One*, 9(10), e110014. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0110014>

Costa, L. E., Lima, M. I. S., Chávez-fumagalli, M. A., Menezes-souza, D., Martins, V. T., Duarte, M. C., ... Coelho, A. F. (2014). Subtractive Phage Display Selection from Canine Visceral Leishmaniasis Identifies Novel Epitopes That Mimic *Leishmania infantum* Antigens with Potential Serodiagnosis Applications. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(1), 96–106. <http://doi.org/10.1128/CVI.00583-13>

Costa, L. E., Salles, B. C., Alves, P. T., Dias, A. C., Vaz, E. R., Ramos, F. F., ... Coelho, E. A. F. (2016). New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *Journal of Immunological Methods*, 434, 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2016.04.005>

Davies, C. R., Llanos-cuentas, E. A., Sharp, S. J., Canales, J., Leon, E., Alvarez, E., ... Dye, C. (1997). Cutaneous Leishmaniasis in the Peruvian Andes : Factors Associated with Variability in Clinical Symptoms , Response to Treatment , and Parasite Isolation Rate. *Clinical Infectious Diseases*, 25(2), 302–310. <http://doi.org/10.1086/514535>

De Lima Barros, M. B., Schubach, A., Francesconi-do-Valle, A. C., Gutierrez-Galhardo, M. C., Schubach, T. M. P., Conceicao-Silva, F., & Cuzzi, T. (2005). Positive

Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. *Acta Tropica*, 93(1), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.004>

De Pádua Vidigal, C., Marcussi, V. M., Marcussi, L. M., Mikcha, J. M., Arraes, S. M. A. A., Lonardon, M. V, & Silveira, T. G. (2008). Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 107(2), 208–212. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.026>

Deckers, N., Saerens, D., Kanobana, K., Conrath, K., Victor, B., Wernery, U., ... Dorny, P. (2009). Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *International Journal for Parasitology*, 39(5), 625–633. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.012>

Derda, R., Tang, S. K., Li, S. C., Ng, S., Matochko, W., & Jafari, M. R. (2011). Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification. *Molecules*, 16(2), 1776–1803. <http://doi.org/10.3390/molecules16021776>

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–318. <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

Duarte, M. C., Pimenta, D. C., Menezes-Souza, D., Magalhaes, R. D., Diniz, J. L., Costa, L. E., & Fernandes, A. P. (2015). Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*,

22(11), 1187–1196. <http://doi.org/10.1128/CVI.00465-15>.Editor

Dubel, S., Stoevesandt, O., Taussig, M. J., & Hust, M. (2010). Generating recombinant antibodies to the complete human proteome. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 333–339. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.05.001>

Dumoulin, M., Conrath, K., Meirhaeghe, A. V, Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.... Matagne, A. (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*, 11(3), 500–515. <http://doi.org/10.1110/ps.34602.500>

Ellis, S. E., Newlands, G. F., Nisbet, A. J., & Matthews, J. B. (2012). Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens. *Parasite Immunology*, 34(5), 285–295. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01317.x>

Espinosa, D., Boggild, A. K., Deborggraeve, S., Laurent, T., Valencia, C., Pacheco, R., ... Are, J. (2009). Leishmania OligoC-TesT as a Simple , Rapid , and Standardized Tool for Molecular Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), 2560–2563. <http://doi.org/10.1128/JCM.00259-09>

Farrell, J. P. (2002). The immunology of cutaneous leishmaniasis: experimental infections and human disease. In *Leishmania*. Springer US, 151–168. [http://doi.org/10.1007/978-1-4615-0955-4\\_11](http://doi.org/10.1007/978-1-4615-0955-4_11)

Ferreira, M. P., Maria, A., Roselino, F., Maria, M., Nascimento, P., & Aires, J. M. (2006). Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of ant-*L. braziliensis*

antibodies compared to their tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(4), 215–217. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652006000400008>

Fragments, F., & Putnam, W. (1979). Primary Structure of a Human IgA 1 Immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. *Journal of Biological Chemistry*, 254(8), 2865–2874.

Francesquini, F. C., Silveira, F. T., Passero, L. F., Tomokane, T. Y., Carvalho, A. K., Corbett, C. E., ... State, P. (2014). Salivary gland homogenates from wild-caught sand flies *Lutzomyia flaviscutellata* and *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus* showed inhibitory effects on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB / c mic. *International Journal of Experimental Pathology*, 95(6), 418–426. <http://doi.org/10.1111/iep.12104>

Fuentes Paredes, F. D., Yanavilca, M., Amelia, R., Rosales Fernandez, A. L., Tarmeño, C., & Alberto, R. (2008). *Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón*.

Geyer, C. R., Mccafferty, J., Dübel, S., Bradbury, A. R., & Sidhu, S. S. (2012). Recombinant Antibodies and In Vitro Selection Technologies. *Antibody Methods and Protocols*, 11–32. <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0>

Gomes, C. M., de Paula, N. A., Cesetti, M. V, Roselino, A. M., & Sampaio, R. (2014). Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis* – endemic area. *Diagnostic Microbiology and*

*Infectious Disease*, 79(4), 413–418. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.002>

González, G., Castillo, D., Estevez, Y., Grentzinger, T., & Deharo, E. (2009). Experimental Parasitology *Leishmania (Viannia) peruviana* (MHOM / PE / LCA08 ): Comparison of THP-1 cell and murine macrophage susceptibility to axenic amastigotes for the screening of leishmanicidal compounds. *Experimental Parasitology*, 122(4), 353–356. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.005>

Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419–433. <http://doi.org/10.1586/eri.10.19>

Grimaldi, G., Tesh, R. B., & McMahon-pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(6), 687–725.

Gupta, N., Goyal, N., & Bhatiaa, N. (2001). Identification of amastigote-specific antigens of *Leishmania donovani* using kala-azar patient sera. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39(7), 623–628.

Hamers-Casterman, C. T., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., & Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446–448. <http://doi.org/10.1038/363446a0>

Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Nijman, I. J., Niewold, T. A., Frenken, L. G., & de Geus, B. (2000). Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct

subfamilies revealing novel sequence features. *Molecular Immunology*, 37(10), 579–590. [http://doi.org/10.1016/S0161-5890\(00\)00081-X](http://doi.org/10.1016/S0161-5890(00)00081-X)

Hashiguchi, Y., Gomez, E. L., Kato, H., Martini, L. R., & Velez, L. N. (2016). Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis : clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical Medicine and Health*, 44(1), 1. <http://doi.org/10.1186/s41182-016-0002-0>

Holzer, T. R., McMaster, W. R., & Forney, J. D. (2006). Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146, 198–218. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.009>

Hoogenboom, H. R. (2002). Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications. In P. M. O'Brien & R. Aitken (Eds.), *Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (pp. 1–37). Totowa, NJ: Humana Press. <http://doi.org/10.1385/1-59259-240-6:001>

Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1105–1117. <http://doi.org/10.1038/nbt1126>

Hoogenboom, H. R., Lutgerink, J. T., Pelsers, M. M., Rousch, M. J., Coote, J., Nieuwenhoven, F. A., & Arends, J. (1999). Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), 774–784.

<http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00214.x>

Houen, G. (Ed). (2015). Peptide Antibodies: Methods and Protocols. *Humana Press*.

<http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3>

Howe, C. (2007). *Gene cloning and Manipulation*. (C. U. Press, Ed.).

Huang, J. X., Bishop-hurley, S. L., & Cooper, M. A. (2012). Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites, *56*(9), 4569–4582. <http://doi.org/10.1128/AAC.00567-12>

Ilgoutz, S. C., & Mcconville, M. J. (2001). Function and assembly of the Leishmania surface coat. *International Journal for Parasitology*, *31*(9), 899–908.

Jensen, A. T., Gaafar, A., Ismail, A., & Christensen, C. B. (1996). Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *55*(5), 490–495.

Jensen, K. B., & Kristensen, P. (2005). Isolation of recombinant phage-displayed antibodies recognizing skin keratinocytes. *Epidermal Cells: Methods and Protocols*, 359–370. <http://doi.org/10.1385/1-59259-830-7:359>

Jeronimo, S. M., & Pearson, R. D. (1992). The Leishmania. In *In Intracellular Parasites* (p. 1–37. Springer US). [http://doi.org/10.1007/978-1-4899-1651-8\\_1](http://doi.org/10.1007/978-1-4899-1651-8_1)

Jespers, L., Schon, O., James, L. C., Veprintsev, D., & Winter, G. (2004). Crystal Structure of HEL4, a Soluble, Refoldable Human V H Single Domain with a Germ-



line Scaffold. *Journal of Molecular Biology*, 337(4), 893–903.

<http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.013>

Kabat, E. A., Te Wu, T., Foeller, C., Perry, H. M., & Gottesman, K. S. (1992). *Sequences of proteins of immunological interest*. DIANE publishing.

Kay, B. K., Kurakin, A. V., & Hyde-deruyscher, R. (1998). From peptides to drugs via phage display. *Drug Discovery Today*, 3(8), 370–378. [http://doi.org/10.1016/S1359-6446\(98\)01220-3](http://doi.org/10.1016/S1359-6446(98)01220-3)

Kholer, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495–497. <http://doi.org/10.1038/256495a0>

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. Macmillan.

Kloehn, J., Saunders, E. C., Callaghan, S. O., & Dagley, M. J. (2015). Characterization of Metabolically Quiescent Leishmania Parasites in Murine Lesions Using Heavy Water Labeling. *PloS Pathog*, 11(2), e1004683. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004683>

Kristensen, P., & Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding and Design*, 3(5), 321–328. [http://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00044-3](http://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00044-3)

Kroeger, A. (1987). *Atención primaria de salud: Principios y métodos*.

Kumar, A. (2013). *Leishmania and Leishmaniasis*.

- Labrou, N. E. (2014). *Protein Downstream Processing* (Humana Pre).
- Lee, C. M., Iorno, N., Sierro, F., & Christ, D. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2(11), 3001–3008. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.448>
- Lemrani, M., Hamdi, S., Laamrani, A., & Hassar, M. (2009). PCR detection of Leishmania in skin biopsies. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(2), 115–122. <http://doi.org/10.3855/jidc.511>
- Lin, S., & Guidotti, G. (2009). *Purification of Membrane Proteins. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63035-4](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63035-4)
- Lodge, R., & Descoteaux, A. (2008). Leishmania Invasion and Phagosome Biogenesis. In B. A. Burleigh & D. Soldati-Favre (Eds.), *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry* (pp. 174–181). New York, NY: Springer New York. [http://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6\\_14](http://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_14)
- Lopes, A. H., Souto-padrón, T., Dias, F. A., Gomes, M. T., Rodrigues, G. C., Zimmermann, L. T.,... Vermelho, A. B. (2010). Trypanosomatids : Odd Organisms , Devastating Diseases. *Open Parasitol J*, 4, 30–59.
- Lucas, C. M., Franke, E. D., Cachay, M. I., Tejada, A., Cruz, M. E., Kreutzer, R. D., & Watta, D. M. (1998). Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,

59(2), 312–317.

Mandrup, O. A., Friis, N. A., Lykkemark, S., Just, J., & Kristensen, P. (2013). A Novel Heavy Domain Antibody Library with Functionally Optimized Complementarity Determining Regions. *PloS One*, 8(10), e76834. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076834>

Maynard, J., & Georgiou, G. (2000). Antibody engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2(1), 339–376. <http://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.339>

Mcconville, M. J., & Bacic, A. (1990). The glycoinositolphospholipid profiles of two *Leishmania major* strains that differ in lipophosphoglycan expression. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 38(1), 57–67. [http://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90205-Z](http://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90205-Z)

Mcconville, M. J., & Blackwelli, J. M. (1991). Developmental Changes in the Glycosylated Phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15170–15179.

Menendez, A., & Scott, J. K. (2005). The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry*, 336(2), 145–157. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.048>

Menezes-souza, D., Oliveira, A. De, Gomes, D. S., & Reis-cunha, J. L. (2014). Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(7), 949–959.

<http://doi.org/10.1128/CVI.00151-14>

Ministerio de Salud-Oficina General de Epidemiología. (2000). Leishmaniasis: Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos N°8. Retrieved from [http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud\\_publica/mod\\_tec/8.pdf](http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/mod_tec/8.pdf)

Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J., & Van der Auwera, G. (2011). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *31*(7), 1453–1461. <http://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>

Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies : current status. *Reviews in Molecular Biotechnology*, *74*(4), 277–302. [http://doi.org/10.1016/S1389-0352\(01\)00021-6](http://doi.org/10.1016/S1389-0352(01)00021-6)

Muyldermans, S. (2013). Nanobodies : Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, *82*, 775–797. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>

Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A., & Hamers, R. (1994). Sequence and structure of V H domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering*, *7*(9), 1129–1135. <http://doi.org/10.1093/protein/7.9.1129>

Naderer, T., Vince, J. E., & Mcconville, M. J. (2004). Surface Determinants of *Leishmania* Parasites and their Role in Infectivity in the Mammalian Host. *Current*

*Molecular Medicine*, 4(6), 649–665. <http://doi.org/10.2174/1566524043360069>

Naiyer, M. M., Saha, S., Hemke, V., Roy, S., Singh, S., Musti, K. V., & Saha, B. (2013). Identification and characterization of a human IL-10 receptor antagonist. *Human Immunology*, 74(1), 28–31. <http://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.09.002>

Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., & Winter, G. (1994). Antibody fragments from a  $\phi$ 107 phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal*, 13(3), 692–698.

Obishakin, E., Stijlemans, B., & Santi-rocca, J. (2014). Generation of a Nanobody Targeting the Paraflagellar Rod Protein of Trypanosomes. *PloS One*, 9(12), e115893. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115893>

Odiwuor, S., Veland, N., Maes, I., Arévalo, J., Dujardin, J., & Auwera, G. Van Der. (2012). Infection, Genetics and Evolution Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms , and clinical implications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1994–2002. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.028>

Okwor, I., & Uzonna, J. (2016). Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3), 489–493. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>

Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, 10–18. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology*, 31(3), 169–217. [http://doi.org/10.1016/0161-5890\(94\)90001-9](http://doi.org/10.1016/0161-5890(94)90001-9)

PAHO-WHO. (2016). LEISHMANIASIS: Informe Epidemiológico de las Américas. Retrieved from [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=6722&Itemid=40754&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=6722&Itemid=40754&lang=es)

Pain, C., Dumont, J., & Dumoulin, M. (2015). Biochimie Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie*, 111, 82–106. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.012>

Palma, G., & Gutierrez, Y. (1991). Laboratory Diagnosis of Leishmania. *Clin Lab Med*, 11(4), 909–922.

Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, 28(6), 849–858. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>

Pansri, P., Jaruseranee, N., Rangnoi, K., Kristensen, P., & Yamabhai, M. (2009). A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens, *16*, 1–16. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-9-6>

Paoli, G. C., Chen, C.-Y., & Brewster, J. D. (2004). Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunological Methods*, 289(1), 147–155. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.001>

Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 2–11. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-0270-9>

Pescher, P., Blisnick, T., Bastin, P., & Späth, G. F. (2011). Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular Microbiology*, 13(7), 978–991. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01593.x>

Petropoulos, K. (2012). Phage Display. In G. Proetzel & H. Ebersbach (Eds.), *Antibody Methods and Protocols* (pp. 33–51). Totowa, NJ: Humana Press. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0\\_3](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0_3)

Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., & Sacks, D. L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, 72(2), 191–204. [http://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90137-L](http://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90137-L)

Pini, A., Giuliani, A., Falciani, C., Runci, Y., Ricci, C., Lelli, B., ... Molcolare, B. (2005). Antimicrobial Activity of Novel Dendrimeric Peptides Obtained by Phage Display Selection and Rational Modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2665–2672. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2665>

Qi, H., Lu, H., Qiu, H., Petrenko, V., & Liu, A. (2012). Phagemid Vectors for Phage Display : Properties , Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology*, 417(3), 129–143. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>

Rasti, S., Ghorbanzadeh, B., Kheirandish, F., Mousavi, S. G., Pirozmand, A., Hooshyar, H., & Abani, B. (2016). Comparison of Molecular , Microscopic , and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 6, 1–6. <http://doi.org/10.1002/jcla.21910>

Rebeski, D. E., Winger, E. M., Shin, Y., Lelenta, M., Robinson, M. M., Varecka, R., & Crowther, J. R. (1999). Identification of unacceptable background caused by non-specific protein adsorption to the plastic surface of 96-well immunoassay plates using a standardized enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Journal of Immunological Methods*, 226(1), 85–92. [http://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00051-4](http://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00051-4)

Reithinger, R., & Dujardin, J.-C. (2007). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis : Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 21–25. <http://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>

Rhaim, R. Ben, & Houimel, M. (2016). Targeting *Leishmania major* parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. *Acta Tropica*, 159, 11–19. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.018>

Rochette, A., Raymond, F., Corbeil, J., Ouellette, M., & Papadopoulou, B. (2009). Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165, 32–47. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.012>

Sacks, D. L., & Melby, P. C. (2015). Animal Models for the Analysis of Immune



Responses to Leishmaniasis. *Current Protocols Immunologic*, 108(19.2.1-19.2.24).

<http://doi.org/10.1002/0471142735.im1902s108>

Santos, A. L., Branquinha, M. H., Davila-Levy, C. M., Kneipp, L. F., & Sodr , C. L. (2014). *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*.

Sarkari, B., Ashrafmansouri, M., Hatam, G., Habibi, P., & Khabisi, S. A. (2014). Performance of an ELISA and Indirect Immunofluorescence Assay in Serological Diagnosis of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/505134>

Skraba, C. M., Fran a, T., Mello, P. De, Pedroso, R. B., Ferreira,  . C., Demarchi, I. G., ... Silveira, V. (2015). Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Revista Da Sociedade Brasileira*, 48(4), 437–444. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0067-2015>

Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage : Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317. <http://doi.org/10.1126/science.4001944>

Soares, K. A., Urdapilleta, A. A., Santos, G. M., Carneiro, A. L., Gomes, C. M., Roselino, A. M., & Sampaio, R. N. (2015). Field validation of a *Leishmania (Leishmania) mexicana* exo-antigens ELISA for diagnosing tegumentary leishmaniasis in regions of *Leishmania (Viannia)* predominance. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(3), 302–307. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.010>

Sorokulova, I. B., Olsen, E. V., Chen, I., Fiebor, B., Barbaree, J. M., Vodyanoy, V. J., ... Petrenko, V. A. (2005). Landscape phage probes for *Salmonella typhimurium*. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1), 55–72.  
<http://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.019>

Strober, W., Kanof, M. E., & Smith, P. D. (1996). Preparation of human mononuclear cell populations and subpopulations. In *Current Protocols in Immunology*, ed Coico C. (John Wiley, New York), (pp. 707–712).

Szargiki, R., Castro, E. A. De, Luz, E., Kowalthuk, W., Machado, Â. M., & Thomaz-socol, V. (2009). Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná , Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13(1), 47–52. <http://doi.org/10.1590/S1413-86702009000100011>

Tanha, J., Nguyen, T., Ng, A., Ryan, S., Ni, F., & Mackenzie, R. (2006). Improving solubility and refolding efficiency of human V H s by a novel mutational approach. *Protein Engineering Design and Selection*, 19(11), 503–509.  
<http://doi.org/10.1093/protein/gzl037>

Texeira, M., de Jesus Santos, R., Sampaio, R., Pontes de Carvalho, L., & dos Santos, W. L. (2002). A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research*, 88(11), 963–968.  
<http://doi.org/10.1007/s00436-002-0695-3>

Thekiso, O. M., Bazie, R. S., Coronel-servian, A. M., Sugimoto, C., Kawazu, S. I., &

Inoue, N. (2009). Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Reagents and its Amplification Efficiency on Crude Trypanosome DNA Templates. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(4), 471–475. <http://doi.org/http://doi.org/10.1292/jvms.71.471>

Toledo-machado, C. M., Andrez, R., Avila, M. De, Nguyen, C., Granier, C., Bueno, L. L., ... Fujiwara, R. T. (2015). Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected from Phage Displayed Combinatorial Libraries. *BioMed Research International*, 2015.

Tomlinson. (2002). Tomlinson I + J Human Single Fold scFv Libraries I + J Day To Day Protocol , Adapted For PK Lab . A. Selection on immunotubes. 1–14. Retrieved from <http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/media/143421/tomlinsonij.pdf>

Tonelli, R. R., Colli, W., Alves, M. J., & Carvalho, T. M. (2014). Selection of binding targets in parasites using phage-display and aptamer libraries in vivo and in vitro. *Interaction of Trypanosoma Cruzi with Host Cells*, 3(62), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00419>

Van Nieuwenhove, L. C., Rogé, S., Balharbi, F., Dieltjens, T., Laurent, T., & Lejon, V. (2011). Identification of Peptide Mimotopes of *Trypanosoma brucei gambiense* Variant Surface Glycoproteins. *PloS Negl Trop Dis*, 5(6), e1189. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001189>

Veland, N., Boggild, A. K., Valencia, C., Valencia, B. M., Llanos-cuentas, A., Auwera, G. Van Der, ... Arevalo, J. (2012). *Leishmania (Viannia)* Species Identification on

Clinical Samples from Cutaneous Leishmaniasis Patients in Peru : Assessment of a Molecular. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 495–498. <http://doi.org/10.1128/JCM.05061-11>

Victoir, K., De Doncker, S., Cabrera, L., Alvarez, E., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., ... Dujardin, J. C. (2003). Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(1), 80–87. [http://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)90031-9](http://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90031-9)

Vincke, C., & Muyldermans, S. (2012). Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies. In D. Saerens & S. Muyldermans (Eds.), *Single Domain Antibodies: Methods and Protocols* (pp. 15–26). Totowa, NJ: Humana Press. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6\\_2](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_2)

Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Molecular Immunology*, 34(16), 1121–1131. [http://doi.org/10.1016/S0161-5890\(97\)00146-6](http://doi.org/10.1016/S0161-5890(97)00146-6) Get rights and content

Ward, E. S., Gussow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., & Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341, 544–546. <http://doi.org/10.1038/341544a0>

Weigle, K. A., Labrada, L. A., Lozano, C., Santrich, C., Barker, D. C., & Icrobiol, J. C. (2002). PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis

Caused by *Leishmania (Viannia)*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 601–606.

<http://doi.org/10.1128/JCM.40.2.601>

Whitlow, M., Bell, B. A., Feng, S., Fupula, D., Hardman, K. D., Hubert, S. L., ...

Schlom, J. (1993). An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering*, 6(8), 989–995.

<http://doi.org/10.1093/protein/6.8.989>

Winter, G., Fuchs, M., Mcconville, M. J., Stierhof, Y., & Overath, P. (1994). Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *Journal of Cell Science*, 107(9), 2471–2482.

Winter, G., & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, 349, 293–299.

<http://doi.org/10.1038/349293a0>

World Health Organization-Department of Control of Neglected Tropical Diseases [WHO]. (2016). Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire, (22), 285–296.

World Health Organization [WHO]. (2010). Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.

Wu, T. T., Johnson, G., & Kabat, E. A. (1993). Length Distribution of CDRH3 in Antibodies. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 16(1), 1–7.

<http://doi.org/10.1002/prot.340160102>

Wu, T. T., & Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *The Journal of Experimental Medicine*, 132(2), 211–250. <http://doi.org/10.1084/jem.132.2.211>

Wu, Y., El Fakhry, Y., Sereno, D., Tamar, S., & Papadopoulou, B. (2000). A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 110(2), 345–357. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00290-5](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00290-5)

Zhang, S., Zettler, C., Cupler, E. J., Hurtado, P., Wong, K., & Rush, R. A. (2000). Neurotrophin 4 / 5 immunoassay: identification of sources of errors for the quantification of neurotrophins. *Journal of Neuroscience Methods*, 99(1), 119–127. [http://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00225-9](http://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00225-9)

Zhao, A., Tohidkia, M. R., Siegel, D. L., Coukos, G., & Omid, Y. (2016). Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 276–89. <http://doi.org/10.3109/07388551.2014.958978>

Zilberstein, D., & Shapira, M. (1994). The role of pH and temperatures in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1), 449–470. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002313>

### **XIII. Anexos**

**Anexo 1.** Secuencia de los primers T7 para el secuenciamiento.

>T7promoter

TAATACGACTCACTATAGGG

>T7terminator

GCTAGTTATTGCTCAGCGG

**Anexo 2.** Secuencias de aminoácidos de sdAb HEL4 con código (GenBank: CQ761108.1).

>Secuencia del HEL4 CQ761108.1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC  
CCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTTAGGATTAGCGATGAGGATAT  
GGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTATCAAGC  
ATTTATGGCCCTAGCGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
GTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA  
ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTATTGCGCGAGTGCTTTG  
GAGCCGCTTTCGGAGCCCCTGGGCTTTTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCAC  
CGTCTCGAGC