

# TRIBUNA DEL INVESTIGADOR

Volumen 21, número 2, 2020

[www.tribunadelinvestigador.com](http://www.tribunadelinvestigador.com)



## 55 Años del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”

Revista de la Asociación  
para el Progreso de  
la Investigación  
Universitaria (APIU)

[www.apiu.org.ve](http://www.apiu.org.ve)

#### CONSEJO DIRECTIVO PERÍODO 2018-2020

Alexis Mendoza-León  
*Presidente*

Leonel Salazar Reyes-Zumeta  
*Vicepresidente*

Maira Cabrera  
*Tesorera*

Isabel Andueza  
*Secretaria de Actas*

Juan Fernando Marrero  
*Secretario de Correspondencia*

#### TRIBUNA DEL INVESTIGADOR COMITÉ EDITORIAL 2018-2020

Consuelo Ramos De Francisco  
*Editor-Jefe*

Tomás Istúriz  
*Editor Adjunto*

#### EDITORES INVITADOS

Noris Rodríguez

Maira Cabrera

Alexis Mendoza-León

#### REPRESENTANTES EN EL CONSEJO EDITORIAL

Alberto Lovera  
*Arquitectura*

María Isabel Giacopini  
*Medicina*

Liliana López  
*Ciencias*

Gabriela Contreras  
*Ingeniería*

Laura Escalona  
*Odontología*

Levi Galindo  
*Asesor Técnico Acceso Abierto  
(Open Journal Sistem)*

#### COORDINACIÓN

Consuelo Ramos De Francisco  
Noris Rodríguez  
Maira Cabrera  
Alexis Mendoza-León

# Contenido

## EDITORIAL

El Instituto de Biomedicina a los 55 años de su creación 4  
*Noris Rodríguez*

## ARTÍCULOS

Jacinto Convit: vida, obra y accionar para el control de las 7  
endemias  
*Jacinto Convit: life and action for the control of the endemics*  
*Ana María Zulueta, Bailde García*

Educación médica de calidad utilizando tecnologías de 18  
información y comunicación: SOS Telemedicina-UCV 55  
aniversario del Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit"  
*Quality of medical education using information and communication technology:  
SOS Telemedicina-UCV 54th anniversary of the Institute of Biomedicine "Dr. Jacinto  
Convit"*  
*Jesús Francisco Velázquez Rojas*

Dermatología del nuevo milenio: ¿Futuro o ya está aquí? 26  
*Dermatology of the new millennium: Future or is already here?*  
*Zulay Rivera Pineda*

Tejiendo la red de la ciencia para la salud en pro de "Un mundo 35  
apropiado para los niños"  
*Wearing the science network for health in favor of "a world appropriate for  
children"*  
*Alicia Ponte-Sucre*

Diversidad genómica de hongos productores de micosis en 43  
Venezuela  
*Genomic diversity of fungi in systemic mycoses in Venezuela*  
*Primavera Alvarado, Julio Vivas*

Lepra en Venezuela: Puesta al día 52  
*Leprosy in Venezuela: update*  
*Lucibel Crespo, Elsa Rada, José Guevara*

Factores de riesgo en lepra 66  
*Risk factors in leprosy*  
*Teresa Rivera, Noris Rodríguez, Henry Oviedo, José Avilán Rovira,  
Rafael Borges*

Avances sobre una vacuna para la Enfermedad de Hansen 75  
*Advances on a vaccine for Hansen's disease*  
*Nazareth Durán Rondón, Elsa Rada, Óscar Reyes-Jaimes, Lucibel  
Crespo*

Pruebas inmunológicas diagnosticas en la enfermedad de Hansen 90  
*Immunological diagnostic test in Hansen's disease*  
*Elsa Rada, Lucibel Crespo, Ramón Guevara*

*Melinis minutiflora* (capín melao): una gramínea de importancia 98  
alergénica en Venezuela  
*Melinis minutiflora (capim melao) a gramine of allergenic importance in Venezuela*  
*Franca Puccio, Domenico Cifarelli, Elianska López, Isabel Hagel, María  
Cristina Di Prisco, Francesca Castejón*

- Asociación entre factores inmunológicos presentes en la leche materna y el desarrollo de dermatitis atópica en lactantes 105  
*Association between immunological factors present in breast milk and the development of atopic dermatitis in infants*  
**Ingrid Rivera, María Mercedes Hernández, Zulay Rivera, María Cristina Di Prisco, Dennis A. Lugo, Maira Cabrera, Isabel Hagel**
- Factores determinantes de tuberculosis entre los indígenas Warao del Delta Venezolano: genética e inmunidad 116  
*Determinant factors of tuberculosis among Warao indigenous from the Venezuelan Delta: genetic and immunity*  
**Zaida Araujo, Aimé Tillett García, Jacobus H. de Waard**
- Laboratorio de tuberculosis, Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”. 20 años de diagnóstico e investigación 132  
*The laboratory of tuberculosis at the Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”; 20 years of diagnosis and investigation*  
**Franklin Ennodio Claro Almea, Douglas Alexander Silva Duarte, Jacobus H. de Waard**
- Melasma en mujeres latinas y caucásicas de Venezuela 142  
*Melasma in latin and caucasian women of Venezuela*  
**Zulay Rivera, Ingrid Rivera, Victor Ollarves, Dennis A. Lugo, Isabel Hagel**
- Lupus eritematoso anticuerpos antinucleares: AAN, anti ADN, anti RNP, anti SM 151  
*Lupus erythematosus antinuclear antibodies: AAN, anti DNA, anti RNP, anti SM*  
**Aniuský Brazón, Jennifer Frías, Nieves González, Ricardo Pérez-Alfonzo**
- Estrategias de análisis por citometría de flujo de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis cutánea Americana 158  
*Flow cytometric analysis strategies of dendritic cells in peripheral blood of patients with American cutaneous Leishmaniasis*  
**Orquídea L. Rodríguez, Martín A. Sánchez, Félix J. Tapia**
- Estudio molecular de resistencia al antimonio de meglumina (Glucantime®) en aislados de *Leishmania* sp. de referencia internacional y de pacientes con Leishmaniasis cutánea localizada 169  
*Molecular study of resistance to the antimoniate of meglumina (Glucantime®) in isolated of Leishmania sp. of international reference and patients with localized cutaneous Leishmaniasis*  
**Diego Pereira, Noris Rodríguez**
- Estudio preliminar del efecto *in vitro* del extracto de hojas de *Artemisia annua* en el crecimiento de *Leishmania braziliensis* 178  
*Preliminary study of the in vitro effect of the Artemisia annua leaves extract on the growth of Leishmania braziliensis*  
**Zoraya de Guglielmo, Henry Oviedo, Miguel Rojas, Noris Rodríguez**
- Inmunogenicidad de péptidos sintéticos de p36/LACK de *Leishmania donovani* en caninos con leishmaniasis visceral 186  
*Immunogenicity of p36/LACK synthetic peptides of leishmania donovani in canines with visceral leishmaniasis*  
**Dennis A. Lugo, Guillermo Terán-Angel, Maira Cabrera**
- Leishmaniasis visceral: aproximación a un programa de control integral en áreas endémicas del estado Nueva Esparta 195  
*Visceral leishmaniasis: approach to a control program based in health education and georeference*  
**Martín A. Sánchez, Bailde García Guevara, Antonio Salgado**

## SECRETARIA DE COORDINACIÓN

Rosario Rivas G.

## DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

Diego Pereira

Dennis A. Lugo

## Montaje en la página web

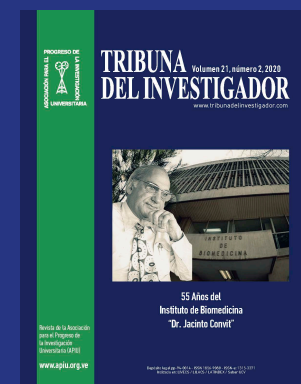
NEXUS RADICAL C.A.

Altamar Pérez

## Montaje Repositorio "Saber UCV"

Levi Galindo

Jhon Martínez



## PORTADA

Fotografía Dr. Jacinto Convit frente a la entrada Instituto de Biomedicina.

Autor: Dennis A. Lugo

Depósito Legal pp 94-0014  
 ISSN-E: 1856-9080  
 ISSN: 1315-3371

## ARBITROS

Dra. Ana María Zulueta  
filipanmari@gmail.com  
*Universidad Latinoamericana y del Caribe*

Dr. Andrés Vélez  
velezandres@gmail.com  
*Universidad de Antioquia, Colombia*

Dra. Mireya Mendoza  
miremar13.men@gmail.com  
*SAIB, Ministerio de Salud*

Dra. Mercedes España  
mefiesce@gmail.com  
*Hospital El Algodonal, MPPS*

Dr. Arnaldo L. Capriles  
arnaldocapriles@gmail.com  
*Hospital San Juan de Dios*

MSc. Guillermo Terán  
guillermondi@gmail.com  
*Facultad de Medicina, IDIC-ULA*

Dr. Néstor Añez  
nañez@ula.ve  
*Facultad de Ciencias, ULA*

Dr. Jesús Velázquez  
jevela@gmail.com  
*Facultad de Medicina, UCV*

Dr. Edwin E. Escobar  
edscobar@gmail.com  
*Escuela de Medicina J.M. Vargas, UCV*

*Instituto de Inmunología, UCV:*

Dr. Félix Toro  
torfelix@gmail.com  
Dr. Juan Carlos Jiménez  
jcjimenez@gmail.com  
Dra. Mercedes Zabaleta  
mercedeszabaleta@gmail.com

*Facultad de Ciencias, UCV:*

Dr. Roschman González  
roschman@gmail.com  
Dr. Blas Dorta  
bdorta@gmail.com

*Instituto de Biomedicina, UCV:*

Dra. Isabel Hagel  
isabelhagel@gmail.com  
Dra. Maira Cabrera  
mairacab@gmail.com

*Escuela de Sociología y Antropología, UCV:*

Dr. Pedro García A  
pedro.garciaa7777@gmail.com  
MSc. Armando Rodríguez  
aarodrib@gmail.com

## REVISORES

Prof. Tomás Istúriz  
toisturiz@outlook.com  
*Facultad de Ciencias, UCV*

Dra. Maritza Padrón  
mpadron43@gmail.com  
*Instituto de Medicina Experimental, UCV*

Dra. Isabel Andueza  
Isabel.andueza@hotmail.es  
*Facultad de Odontología, UCV*

Dr. José Francisco  
chenofra@gmail.com  
*Facultad de Medicina, UCV*

Dr. Ramón Benito Infante  
infantester@gmail.com  
*Facultad de Medicina, UCV*

Viviendo dentro del enemigo: supervivencia de *Leishmania* en el interior de células fagocíticas 203  
*Living within the enemy: survival of leishmania inside the phagocytic cells Zelandia Fermín, Ana Andreína Alviares, Luis José Díaz*

Modelo para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea: interdisciplinaria biomédica, clínica y socio-antropológica 215  
*Model for the treatment of leishmaniasis cutanea: interdisciplinarity (biomedical, clinical and socio-anthropological) José Carrero, Noris Rodríguez, Eliana Carrero, Alberts Carrero, Lexis Carrero*

Reseña de las investigaciones sobre la infección del virus papiloma humano en el Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" 224  
*Review of research on human papillomavirus infection at the Dr. Jacinto Convit Biomedicine Institute María Eugenia Cavazza, Diana Ortiz Princz, Maira Avila, María Correnti*

Innovación biológica en productos para el diagnóstico: un aporte al desarrollo sostenible de la salud en Venezuela 234  
*Biological innovation in products for diagnosis: a contribution to the sustainable development of health in Venezuela Diana Ortiz Princz, Rosabel González, María Argelia Polegre, Primavera Alvarado, María Eugenia Cavazza*

Semblanza de la Dra. Nacarid Aranzazu Hernández 245  
*Maira Cabrera G., Noris Rodríguez*

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES 248

INSTRUCCIONES A LOS ARBITROS/PLANILLA 251

Tribuna del Investigador es una Revista semestral, multidisciplinaria, electrónica publicada por la Asociación para el Progreso de la Investigación Universitaria (APIU). Fundada en 1994 por la Dra. Daissy Marcano bajo su gestión como Presidenta de la APIU, en formato impreso en papel (Vol. 1- N° 1-). Colección digitalizada. Los objetivos fundamentales son:

1. Propiciar la difusión de estudios e investigadores de carácter interdisciplinario relacionados con el quehacer científico y tecnológico nacional e internacional.

2. Estimular el estudio interdisciplinario, promoviendo en forma especial las relaciones entre las humanidades y las ciencias básicas.

3. Contribuir al esclarecimiento de diversos aspectos relacionados con definición e instrumentación de las políticas científicas y tecnológicas nacionales, en sus implicaciones teóricas y prácticas.

4. Ofrecer la oportunidad de confrontar puntos de vista respecto a problemas que afectan a la comunidad de investigadores.

5. Ser un espacio para la divulgación y la confrontación de los hallazgos alcanzados por los miembros de la comunidad científica y tecnológica.

La revista Tribuna del Investigador es una publicación financiada con los recursos provenientes de los aportes de los profesores investigadores adscritos a la APIU/UCV, CDCH/UCV y en algunos casos de otras instituciones.

La revista publica artículos originales, así como ensayos y comunicaciones cortas que tengan a bien publicar el personal de la UCV, así como de otras universidades e instituciones públicas y privadas.

Indizada en LILACS (Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud), LIVECS (Literatura Venezolana en Ciencias de la Salud/SINADIB/UCV), LATINDEX y Saber UCV.

Derechos reservados. Esta publicación no puede ser reproducida sin permiso escrito de los editores.

Copyright: All rights reserved. No part of this publication may be reproduced without written permission from the Publisher.

## EDITORIAL

# “El Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit a los 55 años de su creación”

El Instituto de Biomedicina, nace el 4 de junio de 1965 con el nombre provisorio de “Centro de Investigaciones Dermatológicas de la Universidad Central de Venezuela”; por solicitud de la Facultad de Medicina ante el Consejo Universitario, lo cual fue aprobado por ese cuerpo colegiado el 16 de Junio del mismo año. Este centro estaba integrado por la cátedra de dermatología de la Escuela de Medicina “Dr. José María Vargas”, el Servicio de Dermatología del Hospital Vargas y la División de Dermatología Sanitaria del Ministerio de Salud y además contaba con diversos laboratorios de investigación científica y con los post grados de Dermatología y Microbiología Médica, cuyos primeros especialistas egresaron en 1966 y 1967 respectivamente.

En 1969 en reunión conjunta con todos los representantes de los entes que conformaban el centro de Investigaciones Dermatológicas, el Dr. Convit planteó en dicha reunión, la posibilidad de unificar las tres entidades en una nueva construcción, que se llamaría “Instituto Nacional de Dermatología”. Todos estuvieron de acuerdo con la idea, vistas las facilidades operacionales y de integración del equipo humano. El Dr. Convit, junto con el Dr. Kerdel Vegas y la ayuda de la Dra. Cecilia Pimentel, logran del presidente Rafael Caldera, la promesa de la construcción del Instituto, el cual fue inaugurado el 29 de noviembre de 1971. A principios de 1972 fue reconocido como Instituto Universitario de la Universidad Central de Venezuela, adscrito a la Facultad de Medicina; designándose como su primer director al Dr. Jacinto Convit, ocupando el cargo hasta el 12 de mayo de 2014 cuando fallece.

A partir de 1973, se fueron añadiendo nuevos campos de investigación en el Instituto, con la creación de nuevos laboratorios de investigación en áreas como: Fisiopatología, Inmunoreumatología, Microscopía electrónica, Dermopatología, Biología Molecular, Ingeniería genética, Microbiología, Inmunoparasitología, Biología Celular, Epidemiología e Inmunología. Esta expansión fue posible por el ingreso al Instituto de muchos profesionales formados en el exterior en distintas disciplinas y financiados por la Universidad Central de Venezuela, el Ministerio de Salud y otros entes públicos. Debido a esta expansión, se solicitó a la Universidad el cambio de nombre de “Instituto de Dermatología” a “Instituto de Biomedicina”, lo cual fue aprobado por el Consejo Universitario en sesión ordinaria el 15 de marzo de 1984. Igualmente fue aprobado por el Ministerio de Salud, por

resolución G-326, del 19 de octubre de 1984.

El 28 mayo del 2014, luego del fallecimiento del Dr. Convit; el Instituto es denominado: Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", por decisión del Consejo Universitario; nombre que también fue adoptado por el Ministerio de Salud, en junio de 2014. El Dr. Convit, médico, egresado de la Universidad Central de Venezuela optó por el título de Doctor en Ciencias Médicas presentando el trabajo "Fracturas de la Columna Vertebral" en 1938.

Sin embargo, su experiencia en el área sanitario-epidemiológica empezó un año antes cuando siendo aún estudiante fue invitado por el Dr. Martín Vegas, profesor de dermatología en la Facultad de Medicina, y el Dr. Carlos Gil Yépez a visitar la leprosería de Cabo Blanco ubicada en el departamento Vargas del Distrito Federal. Una vez que se graduó fue designado médico residente de esa leprosería, donde trabajo entre los años 1940 y 1943 atendiendo a los pacientes de lepra. Esa actividad, lo convirtió en un gran estudioso y apasionado investigador de dicha enfermedad.

El Dr. Convit alcanzó un alto nivel de reconocimiento científico internacional, con más de 200 artículos científicos publicados. Su última publicación la realizó a la edad de 99 años, en el 2013, poco tiempo antes de su fallecimiento.

A los 55 años de su creación, el Instituto de Biomedicina cuenta con 4 post grados: Dermatología, Microbiología Médica, Dermopatología y Epidemiología de las Enfermedades Endémicas; todos adscritos a la UCV. En la actualidad se tienen 26 secciones o laboratorios de investigación en las distintas disciplinas del conocimiento, dirigidos por profesionales con alta formación, donde se desarrollan investigaciones científicas relacionadas con las distintas enfermedades que afectan a la población venezolana, tales como: Lepra, Leishmaniasis, Micosis, Alergias, Parasitosis intestinales, Tuberculosis, Enfermedades infecciosas, Virus de Papiloma Humano y Oncocercosis.

Todas estas investigaciones han conducido a resolver muchos problemas de salud que afectan a la población más vulnerable.

El Instituto realiza una importante labor asistencial, donde se integran dermatólogos, epidemiólogos y estudiantes de los post grados, que debidamente supervisados, atienden las siguientes consultas: Clínica de tumores, clínica de psoriasis, dermatología pediátrica, clínica de acné, consulta de micología, consulta de lepra, consulta de leishmaniasis, lesiones de vulva, clínica de dermatitis y clínica de alergias. Así mismo sigue siendo la sede de la cátedra de Dermatología y Sifilografía de la escuela de Medicina "Dr. José María Vargas", contribuyendo a la formación de los nuevos profesionales de la Medicina.

En este número de la revista Tribuna del Investigador, órgano divulgativo de la Asociación para el Progreso de la Investigación Universitaria (APIU) de la UCV; a cuyos editores y junta directiva, agradecemos la oportunidad de publicar el trabajo que realizan los investigadores del instituto en los diferentes laboratorios y en la sección clínica. Todos los artículos que se publicaran en este número, son el producto del trabajo en equipo, lo cual caracteriza al Instituto de Biomedicina desde su creación. Enfermedades como la Lepra y la Leishmaniasis son las más estudiadas en el instituto, una muestra de ello está representada en 8 trabajos que incluyen a dermatólogos, epidemiólogos e investigadores, quienes han obtenido grandes logros para el conocimiento de estas patologías. Así mismo se presentan trabajos en equipo en las áreas de alergias, VPH y tuberculosis. También incluimos en este volumen, un artículo referido a un modelo de proyecto, concebido por varios laboratorios del Instituto, para la producción a gran escala de antígenos, que podrían ser utilizados en el diagnóstico de distintas enfermedades, que afectan a la

Universidad Central de Venezuela, Los Chaguaramos. Instituto de Medicina Experimental, PB al lado del Auditorio "Augusto Pi Suñer".

Teléfono: 0580212-605-3307

Apartado Postal 50587, Sabana Grande.

www.apiu.org.ve  
www.tribunadelinvestigador.com  
apiu@ucv.ve  
ucvapiu@gmail.com  
ucvapiu@yahoo.es  
Twitter: @apiu-ucv

Edición y patrocinio de esta revista ha sido financiada con el apoyo del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UCV), Instituto de Biomedicina, Asociación de Egresados y Amigos de la UCV y MEDITRON C.A.



población venezolana y otros países de la región. Adicionalmente, se incluyen en este número, importantes contribuciones de destacados investigadores invitados a la conmemoración de nuestro 54 aniversario. Entre ellos se encuentra el trabajo presentado por la Dra. Ana María Zulueta, quien trabajó al lado del Dr. Convit por más de 20 años, en la implementación de los programas para el control de la lepra en Venezuela. El trabajo presentado por el Dr. Jesús Velázquez, con sus grandes aportes en la “Aplicación de las tecnologías de la información en la educación Médica”. Así mismo se incluye la ponencia presentada por la Dra. Alicia Ponte Sucre, titulada “Un Modelo de Red para la Salud en Pro de un Mundo Apropiado para los Niños y el trabajo presentado por la Dra. Zulay Rivera, sobre un tema de gran actualidad, denominado “Dermatología de la Nueva era”.

Todos los trabajos que incluimos en este volumen, constituyen un gran aporte en diversas áreas del conocimiento científico, que será de gran impacto para los investigadores y docentes del país y de la comunidad científica en general.

*Noris Rodríguez*  
*Directora Instituto de Biomedicina,*  
*UCV*



**Ingresar a [saber.ucv.ve](http://saber.ucv.ve)**  
Aumenta la visibilidad  
de sus publicaciones

# Jacinto Convit: vida, obra y accionar para el control de las endemias

**Ana Zulueta<sup>1</sup>**  
filipanmari@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-5973-7299>

**Bailde García<sup>2</sup>**  
baildemaria@gmail.com

<sup>1</sup> Universidad Latinoamericana y del Caribe. Ciencias de la Educación.

<sup>2</sup> Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

El presente artículo tiene por objeto destacar la trayectoria de vida profesional, científica y humana del Doctor Jacinto Convit, en el marco de la celebración del 55º Aniversario del Instituto de Biomedicina (julio año 2019) del cual fue fundador. A tales fines, se aplicaron los principios de una triangulación de exploración e interpretación de diversas fuentes bibliográficas, documentales, así como reflexión, de experiencias acumuladas por parte de las autoras, vinculadas a una parte significativa de la dinámica de vida de este insigne médico venezolano. Se aplicó la técnica de análisis de contenido para identificar factores/elementos claves, que marcaron su existencia. Los resultados, enfatizan el legado de un ser humano que, desde su praxis como estudiante del último año de Medicina, inició su ejercicio asistencial, vinculado a programas de atención, dirigido a poblaciones vulnerables y socialmente excluidas, que le motivó y condujo al complejo mundo de la investigación científica. Las conclusiones resaltan una experiencia de vida, referencia para el personal médico y todo trabajador que se dedique a la Salud Pública para ratificar la salud como valor de vida y desarrollo social de los pueblos desestimando la exclusividad basada en ausencia de enfermedad.

**Palabras clave:** Jacinto Convit; Paradigma; humanista; transformador de la salud; Control de endemias.

## JACINTO CONVIT: LIFE AND ACCION FOR THE CONTROL OF THE ENDEMIC

### ABSTRACT

The objective of the present article is to highlight the trajectory and achievements in the scientific, professional, and human perspectives of Doctor Jacinto Convit within the celebration of the 55<sup>th</sup> Anniversary of the Institute of Biomedicine (July year 2019). Through a triangulation of research and analysis of various bibliographic sources, documentaries and accumulated experiences by the authors linked to a significant area of the dynamics of life of this remarkable Venezuelan physician. The analysis of content technique was applied in order to identify factors that were

determinant in his life. Results emphasize the legacy of a human being that since the beginning of his praxis as a last year student of Medicine started his professional exercise linked to care programs oriented towards vulnerable people socially excluded. This fact leads him to the complex world of scientific research. Conclusions highlight an experience of life, reference for physicians and every personnel working in public health to ratify this as a life value and social development of the countries; dismissing the exclusiveness based on absence of illness.

**Keywords:** Jacinto Convit, Paradigm; humanist; developer of health; Endemics control.

## INTRODUCCION

La orientación del presente artículo, es develar la trayectoria asistencial y científica enmarcada en una visión humanista de la gestión desarrollada por el Doctor Jacinto Convit, reconocido científico venezolano, cuyo ejercicio profesional como médico sanitarista – especialista – investigador – educador, siempre estuvo enfocada a una cosmovisión genuina de la integración de la prestación de servicios de atención en salud de forma holística. Referentes claves de su accionar para lograr con igual tenor de importancia, el control de los procesos mórbidos y la transformación favorable de las expectativas sociales en las comunidades endémicas.

Bajo estas premisas, desde sus inicios como profesional de la salud, lideró equipos multidisciplinarios de alto desempeño y permaneció hasta el último de sus días, anclado a la desmitificación de la lepra como enfermedad estigmatizante socialmente, así como prevención y control de otras endemias, que afectaban a poblaciones tradicionalmente excluidas desde su contexto socio-cultural y sanitario.

Por tales razones, en reconocimiento a la trayectoria humana y científica de este valioso profesional de la salud, las autoras del presente artículo aplicaron los principios de una triangulación de exploración e interpretación de diversas fuentes bibliográficas, documentales, así como reflexión, de experiencias acumuladas por parte de las autoras,

vinculadas a una parte significativa de la dinámica de vida de este insigne médico venezolano que acreditaran el estudio de su vida, obra y accionar en el ejercicio profesional durante su existencia, cuyos logros alcanzados, para el control de las enfermedades endémicas, han sido reconocidos nacional e internacionalmente para el control de enfermedades endémicas, haciéndolo merecedor de numerosas preseas y títulos, por su destacado trabajo en beneficio de la Salud Pública.

En este sentido, a la luz de las necesidades expuestas por reconocidos sectores priorizados de población y sustentados en la develación de elementos claves, producto de esta investigación realizada, consideramos congruente motivar en el lector/autoridades de salud, la reflexión sobre el modelo tradicional de prestación de servicios de atención, implantado por nuestro Sistema Público Nacional de Salud que permita la incorporación de nuevos paradigmas dirigidos a la prevención, atención y control de daños, que respondan a nuestras auténticas necesidades socio-sanitarias y culturales.

## METODOLOGÍA

Las bases que sustenta la construcción de este artículo, derivado de la Conferencia presentada en la fecha aniversario del Instituto de Biomedicina (julio, 2019), se enmarca en la revisión y análisis crítico de diferentes fuentes de investigación de tipo bibliográfico y documental, las cuales se encausan hacia la sistematización de la vida y obra del Doctor Jacinto Convit desde una mirada integradora.

Ante la densa y compleja bibliografía disponible del Doctor Convit, fue necesario aplicar técnicas de organización, sistematización y análisis de contenido, de los diferentes materiales consultados, a fin de vincular lo humano –científico en su accionar profesional y presentar una imagen más cercana al ser humano en sus diferentes dimensiones. Es por tales razones, que se fortaleció dicho análisis con la técnica de triangulación validada por Denzin en 1970 (citado por la autora Arias, V. María, M., 2000), quien abarca en las formas de contrastación: datos de investigadores, teorías, de métodos y múltiple. Así, se

realizó la contrastación independiente de éstos y las evidencias del quehacer cotidiano/institucional registrado del mencionado Doctor, que posteriormente a través de comparación y consenso permitió la conciliación de los hallazgos presentados en los resultados. Al respecto, señalan los autores Cohen *et al.* (1990), que este tipo de indagación ofrece datos más válidos y confiables.

Igualmente, se enriqueció esta triangulación de datos, con información procedente de la voz de las autoras del presente artículo, quienes pueden valorarse como actores/testigos directos de una parte significativa del recorrido humano y profesional de este insigne ser humano. Por tanto, en este orden de ideas y mediante la realización de video-conferencias, fue posible acopiar recuerdos, compartir experiencias, reflexionar de manera conjunta, debatir y ampliar ideas; así como, consolidar los hallazgos presentados en los resultados y conclusiones, utilizando una metodología fructífera de trabajo colaborativo horizontal.

Producto de estos encuentros fue posible entonces: (a) plasmar en este documento evidencias cargadas de incesantes y creadoras iniciativas, así como logros obtenidos en diferentes áreas del conocimiento: investigación científica, docencia y gerencia de programa; transversado todo esto, por una línea de pensamiento centrada en el enfoque humanista integrador de la salud de la población, especialmente aquellas vulnerables socialmente; (b) Incluir en la metodología de investigación empleada, novedosas técnicas de contrastación de información dentro de una misma indagación, denominada triangulación múltiple, que valida el análisis de los datos presentados y confiere mayor fiabilidad a la información obtenida. Es así como, generar una investigación para una conferencia centrada en la vida y obra del Doctor Jacinto Convit se convirtió en un desafío de síntesis analítica que certificara su trayectoria de vida, ponderando lo humano y científico de su accionar profesional.

## RESULTADOS

Los resultados de esta investigación, soportada inicialmente en una conferencia de la trayectoria del Doctor Jacinto Convit, nos llevó a experimentar un desafío en superar el paradigma de investigaciones bibliográficas /documentales de tipo tradicional, debido al perfil de este admirable profesional, el cual necesariamente demandó el objetivar otro tipo de análisis de su trayectoria, que permitiera el encuentro de una historia humana y científica, unidos por una esencia del valor de la salud como principal indicador de vida. Así mismo, ampliar su radio de acción al incorporar la educación, con similar grado de importancia, prioridad y pertinencia, desde el ámbito académico, hasta los espacios socio-sanitarios y participación de las comunidades involucradas.

Estos postulados se materializaron en cada momento de su vida a tiempo completo; desde la investigación científica integrada a la docencia y accionar de programas integrales de control de endemias, centrados de manera prioritaria en la población vulnerable, debido a las precarias condiciones socio-económicas y sanitarias presentes en el escenario donde hacen vida, aunado a las condiciones de lejanía y dispersión geográfica que lo caracterizan. Bajo estas consideraciones, se presentan los resultados de la investigación dirigida a la vida y obra del doctor Jacinto Convit, apoyada en una síntesis de tres momentos, armónicamente articulados e interdependientes entre sí, lo que obligatoriamente sugiere su lectura desde su dimensión integral: humana y científica.

### **Momento 1: breve biografía de su vida**

Doctor Jacinto Convit (1913 – 2014). Este ilustre científico venezolano, nació en Caracas, 11 de septiembre de 1913, fue el segundo hijo de la familia Convit-García, madre venezolana de origen canario y padre catalán nacionalizado por el General Cipriano Castro, por tanto, descendiente de padres inmigrantes canarios. Tal como lo relata el Doctor Ávila Bello, J. (1996:21), a pesar de haber pertenecido a las llamadas “familias pudientes” para la época, su formación

académica fue cumplida en el Liceo San Pablo; luego, la secundaria cursada en Liceo Andrés Bello bajo la dirección de dos insignes maestros: Don Rómulo Gallegos y Don Pedro Arnal y materializó su formación profesional en la Universidad Central de Venezuela (U.C.V.), de Caracas, donde obtuvo el título Doctor en Ciencias Médicas (1938). Posteriormente, se especializó en Dermatología en Estados Unidos.

Tal como lo reseña el Doctor Ávila Bello (1996:31), inició su carrera sanitario-epidemiológica en 1937, cuando siendo todavía estudiante de Medicina, fue invitado por los Doctores Martín Vegas y Carlos Gil Yépez para asistir a la Leprosaría de Cabo Blanco; esto motivó que ya graduado, fuese designado residente de la mencionada institución, que, para aquel entonces, tenía más de 80 años de construida y adolecía de recursos médicos para la atención de los enfermos. Es aquí donde inició su aprendizaje sanitario-social-humanista, para atender a los enfermos y mediante la indagación médico/sanitaria, profundizar en el conocimiento y control de esta enfermedad infecciosa, que le acompañó toda su vida profesional. En cuanto a la construcción de su núcleo familiar, relata el mencionado autor Ávila Bello, (1996), que el Doctor Convit (1937), cuando cumplía su internado de pre grado en el centro asistencial, Puesto de Socorro en Caracas, conoció a Rafaela Marotta D'Onofrio, caraqueña de origen italiano, con quien se casó 10 años después, el 1 de febrero de 1947. De esta unión nacieron cuatro hijos, uno en actividad agropecuaria, dos médicos residenciados en Estados Unidos y uno fallecido. Describía a su esposa como una mujer “cariñosa, su compañera de viajes, que le apoyaba en sus proyectos y una madre abnegada y apasionada, un modelo de mujer que ya no hay”. Su esposa falleció en el 2011 y el Doctor Convit, en mayo del 2014.

## **Momento 2: trayectoria profesional**

Como antesala a la trayectoria profesional transitada por el doctor Jacinto Convit, es oportuno destacar que a partir de 1936 se organizó el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS), hoy Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), con la finalidad de iniciar la prevención y control de las

enfermedades transmisibles que para ese momento diezaban la población (ejemplos: lepra, malaria, tuberculosis, Chagas, entre otras); sin embargo, bajo un enfoque fundamentalmente biologicista – unicausal, con verticalidad de acciones clínicas y centralismo gerencial para garantizar el efectivo control de las endemias; siendo pertinente, oportuna y válida dicha metodología de trabajo para ese periodo, a fin de dar respuesta al momento coyuntural socio-histórico vivido para la época.

Es a partir de 1938 que el Dr. Convit se dedicó al tratamiento clínico de la Lepra y en colaboración con el Dr. Martín Vegas, desarrolló campañas educativas para la erradicación colectiva del contagio de la enfermedad por convivencia con leproso. Tal como lo relata el Doctor Ávila Bello (1996), su interés por la investigación surgió cuando era residente de Cabo Blanco y evidenció las incógnitas que existían en torno al conocimiento y comprensión de la mencionada enfermedad; así como, lo que significaba el contacto a diario y la manipulación de estos enfermos.

Es así, motivado por el interés de ayudar a estos enfermos que en 1941, publicó su primer trabajo titulado “El mal de Hansen. Algunas nociones que el público debe conocer sobre la lepra”. Esto, con la finalidad de difundir el conocimiento de esta afección, en una población que vivía en dramáticas condiciones sanitarias. Igualmente, destacar la importancia del médico epidemiólogo de realizar la educación sanitaria de la población como actividad primordial en el control epidemiológico de cualquier enfermedad.

Posteriormente, partir de 1946 inicia su participación en innumerables Congresos Internacionales de Lepra y obtuvo por concurso, el cargo de médico Dermatólogo del Hospital Vargas, siendo instructor y director de su laboratorio. Así, continuó su ascenso profesional y en 1950, fue nombrado Jefe de Clínica Dermatológica del mencionado centro asistencial. En 1962 participó en la creación de la Escuela de Medicina, Dr. José María Vargas, de la UCV y asumió la dirección de la cátedra de Dermatología clínica.

De forma paralela amplió su proyección internacional, pues en 1968 fue nombrado Presidente de la Asociación internacional de la Lepra y reelecto

en 1973. Igualmente, en 1971 fue nombrado por la OMS, Director del Centro Cooperativo para estudio histológico y Clasificación de la Lepra.

En 1971 se constituyó el Instituto Nacional de Dermatología, conocido hoy como Instituto de Biomedicina (I.B.) y el Dr. Convit fue su fundador y Director hasta sus últimos días; compartió esta responsabilidad nacional con la respectiva internacional, ya que a partir de 1976 fue nombrado director del Centro Panamericano de Investigación y Adiestramiento en Lepra y Enfermedades Tropicales (CEPIALET).

Para el año 1980, ingresó como individuo de número en la Academia Nacional de Medicina. Y, en justo reconocimiento a su destacada labor fue merecedor de numerosas preseas y reconocimientos, entre los que se destacan: Príncipe de Asturias (1987). Nominado al Premio Nobel de Medicina (1988). Héroe de la Salud Pública en las Américas (2002). Prize in Medical Sciences (2006). Legión de Honor. República de Francia (2011). Orden Libertadores y Libertadoras (2014) Post Mortem, entre otros.

### **Momento 3: accionar científico-pedagógico para el control de las endemias**

Tal como fue señalado en la sección precedente, el MSAS, hoy M.P.P.S. fue creado en 1936, para atender e interrumpir la transmisión de enfermedades infecciosas que diezmaban la población. Igualmente, bajo postulados con enfoque biologicista, en la década 1940 – 1950, se organizaron progresivamente, los Servicios de Dermatología Sanitaria a nivel nacional, que posteriormente en 1962 se integraron a la División de Dermatología Sanitaria, hoy Instituto de Biomedicina (I.B.). Estos servicios de atención, se organizaron con equipos biomédicos dedicados al desarrollo de actividades de búsqueda, diagnóstico, tratamiento y control de enfermos, integrando acciones de educación sanitaria para el fomento, promoción y prevención de la salud, sustentado en el modelo de atención por niveles de Leavell & Clark, sugerido para este momento histórico por la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) y centrado en la historia natural de la enfermedad y grado de complejidad.

En dichos centros, la prestación de servicios de atención se caracterizó por ser bio-psico-social integral, pero bajo un modelo biologicista, donde los educandos (pacientes y familiares), participaban solo, como sujetos pasivos de las medidas sanitarias y médicas. Dicha estrategia produjo resultados positivos en la reducción temporal de las endemias, pero sin capacidad resolutive sostenible en las comunidades de forma permanente.

Es a partir de la década de 1980 hasta la actualidad, que en forma paralela y progresiva, sustentados en el avance investigativo, que se implementan novedosas modalidades para manejo de los enfermos y formas de tratamiento para la lepra así como otras endemias (Leishmaniasis, Oncocercosis, entre las más relevantes), incorporando además, los estudios en comunidades para detección y control de factores condicionantes, acompañado de extensión de la educación en Salud Pública, para mejorar su calidad de vida.

En consecuencia, la dinámica de vida profesional del Doctor Jacinto Convit como investigador científico, se mantuvo vinculada en forma permanente a una línea de pensamiento crítico, sustentada en la resolución de los problemas de salud en la población y le convirtió en viajero permanente por las diferentes regiones del país, (década noventa e inicios del dos mil), con prioridad hacia las comunidades rurales dispersas e indígenas más vulnerables, debido a su condición geográfica, formas de vida y limitaciones en la producción económica; esto, con la finalidad de contactar de cerca el funcionamiento del programa de control integral de endemias, desarrollado por los Servicios de Dermatología Sanitaria. Un momento y espacio propicio para compartir una de tantas acertadas reflexiones: *“Un médico, un hombre de ciencias, no puede quedarse encerrado en cuatro paredes. Tiene que salir a la calle y ver cuáles son las necesidades de la gente”* Dr. Jacinto Convit.

Es así como, su agudeza de observación analítica y crítica generaba una especie de guía de discusión espontánea con el equipo de salud local y representantes de estas comunidades. Esta experiencia fue registrada por los autores, García

Bailde y Borges Rafael (2004), quienes describieron como, el encuentro con cada comunidad objeto de estudio, resultó una maravillosa oportunidad para los equipos de salud; especialmente, el personal médico joven en proceso de formación, quienes valoraban estos espacios de discusión y reflexión como fortalecimiento académico vinculado a las realidades sociales.

Este acercamiento a las distintas regiones, permitió evidenciar el creciente y progresivo deterioro del sistema de salud del país, con especial énfasis el primer y segundo nivel de atención, donde la capacidad resolutive se encontraba en crisis por el abandono sostenido de las políticas públicas en salud. Citamos como ejemplo, el Programa de Medicina Simplificada, pionero en la salud comunitaria, reconocido en los postulados de la Atención Primaria en Salud (APS), realizada en Alma-Ata Rusia 1978. Situación que afectaba directamente a la población enferma o en riesgo de enfermar, de patologías como la lepra, Leishmaniasis, Oncocercosis, Tuberculosis entre otras.

Esta realidad observada, colmó de preocupación al Doctor Convit, motivándolo a generar diálogos con las autoridades del Ministerio de la Salud, a los fines de sensibilizarlos para buscar alternativas de financiamiento mediante organismos multilaterales como, el Banco Mundial (B.M.)/ Banco Interamericano de Desarrollo (BID), para fortalecer la capacidad resolutive del sistema de salud, especialmente en los niveles I y II de atención, donde se concentra la mayoría de población vulnerable que reside en áreas geográficas dispersas, con precarias formas de vida e inequidades sociales y económicas. Producto del mencionado diálogo inter sectorial, surgió el convenio Ministerio de Salud – BM./BID, el cual se operacionalizó a través de las instituciones: Instituto de Biomedicina - Malariología y Saneamiento Ambiental.

Las evaluaciones de la ejecución de este Convenio fueron significativamente positivas, (realizadas por especialistas externos), pues favoreció a los diferentes programas de control integral de las endemias desde una perspectiva de gestión integral, que abarcó la actualización/fortalecimiento académico de los

equipos de salud, dotación de insumos médicos y dotación de logística e infraestructura tecnológica (equipos de computadora-vehículos), a todos los servicios de Dermatología Sanitaria nacional, a los fines de fortalecer el sistema de registro clínico y epidemiológico, base para su debido procesamiento, análisis y toma de decisiones oportunas, en concordancia con las demandas de cada servicio de atención.

En el marco referencial de logros obtenidos con el mencionado Convenio, es fundamental destacar la iniciativa de la formación de personal técnico con un nuevo perfil de salud integral denominado: Promotores Sociales en Salud, dirigido a jóvenes procedentes de comunidades rurales/dispersas e indígenas, enmarcadas geopolíticamente en estados que sustentados en una evaluación integral, presentaban indicadores críticos desde la mirada sociocultural, económica y de salud. La idea era contribuir con la capacidad resolutive de salud desde un enfoque de educación, prevención, control integral de la salud, bajo la visión de un sistema de vigilancia epidemiológica activa. Esta experiencia fue sistematizada en una publicación por parte de sus Coordinadores (García Bailde y Guevara Milady, 2014), donde se puede resaltar aspectos de interés, referidos a:

El Curso de Promotores Sociales en Salud (con una duración de dos años), certificado por la Dirección de Docencia e Investigación del Ministerio de Salud; se sustentó conceptualmente en los principios de un modelo humanista transformador del



Fuente: Coordinación Curso Promotores Sociales en Salud. (1993)

conocimiento, Estudio-Trabajo, articulándose la producción del pensamiento crítico en salud y el encuentro permanente del trabajo directo con las comunidades a través de investigaciones operacionales, y la conjugación de esfuerzos de un aprendizaje de trabajo en equipo y de esta manera, generar estrategias pertinentes en la contribución de la situación de salud en las comunidades.

Se podría enfatizar que la experiencia compartida con el Doctor Convit en esta fase de su vida, durante la formación este personal técnico en cada estado, resultó un espacio para redefinición de su enfoque como investigador y docente, pues cada encuentro con los estudiantes fue una posibilidad de reflexión. Igualmente, trajinar e interrelacionarse con las personas más humildes de las comunidades, el compartir de saberes trascendió más allá de la presencia de una epidemia. Así, generó un reconocimiento al valor de lo cotidiano como esencia de las dinámicas e interrelaciones de las formas de vida y producción social de las comunidades, donde cobra un espacio sociológico significativo, el supuesto teórico que Mauro Wolf, desarrolló en forma detallada en su trabajo *Sociologías de la Vida Cotidiana* (1994) y donde expresa la importancia de los encuentros sociales, como vía para establecer interacciones de los individuos desde sus formas naturales de organización social y sus relaciones de poder.

## DISCUSIÓN

En la lectura de los resultados, aunque presentados por fases o momentos, puede evidenciarse de manera global que la trayectoria de vida profesional del doctor Jacinto Convit, se caracterizó por un genuino liderazgo integral, sustentado en la responsabilidad, ética, humanismo, pro actividad de ejecución en todos los escenarios recorridos y su cosmovisión holística en la prestación de servicios de atención, a fin de brindar el mayor beneficio a los grupos poblacionales prioritariamente más vulnerables; determinado esto, por las evidencias de inequidades socio-sanitaria presentes y limitaciones para su acceso geográfico. Estos rasgos en esencia de ser humano y científico, armónicamente vinculados, justifican inscribirlo

como personaje de avanzada, para el momento histórico transitado.

Bajo estas premisas, se realizó el análisis integral de la trayectoria del Doctor Convit, desde una visión humana y científica, destacando que su pensamiento/forma de vida, ubicó el resaltador de la salud como valor y calidad de vida de la población, especialmente aquellas con demostrada evidencia de vulnerabilidad. De esta forma, materializó la prestación de los servicios de atención, a través de la articulación permanente de la investigación científica, docencia y la clínica como un medio para conocer, analizar y generar respuestas que contribuyesen a la capacidad resolutoria de salud en estas poblaciones, tomando en cuenta las dinámicas socio-históricas de Venezuela. Oportuno el espacio para referenciar, uno de los investigadores del I.B. (Martín Sánchez, 2014), quien en un artículo referido a la vida del Doctor Convit expresa textualmente lo siguiente:

“...De mi experiencia personal con Convit siempre lo recordaré como un hombre accesible muy humano, pero de carácter férreo!”. Convit respetaba profundamente a los investigadores que lo rodeábamos y más aún nos permitía en su Instituto desarrollar libremente nuestras investigaciones. Nunca faltó el consejo oportuno de su parte cuando se le consultaba alguna inquietud. Siempre fuimos libres de decidir la ciencia que queríamos emprender, y siempre contamos con el apoyo personal e institucional de su parte. Se sentía orgulloso que siguiéramos sus pasos y particularmente me alentó a emprender los proyectos que con carácter transdisciplinario llevamos en leishmaniasis visceral...”.

Es vital resaltar al menos en síntesis, el enfoque de la docencia impartida por el Doctor Convit, quien a pesar de haber recibido una formación académica tradicional, no obstante producto de sus vivencias cotidianas con: el equipo de salud que le acompañaba, pacientes, estudiantes desde el nivel básico hasta profesional especialista, así como la población de comunidades con las cuales generaba reflexiones de la salud en forma sencilla, se evidenció en él un cambio estructural de paradigmas para compartir saberes.

A tales fines, trascendió de la visión de la educación como un evento tradicional o bancario, hacia un instrumento lineal de transmisión de información, tal como lo señala Paulo Freire (1970); así, de manera genuina se adentró a una esencia de la educación como herramienta transformadora de la salud, apuntando en todo momento, un encuentro/dialogo/reflexión con cada uno de los actores sociales, donde de manera muy estratégica a través de cada uno de sus perfiles académicos, psicológicos y socioculturales, seleccionaba sus códigos de lenguaje para facilitar sus mensajes y contenido.

Este pensamiento proactivo de desarrollo integral de la vida humana experimentado por el Doctor Convit, se le puede colocar un sello de originalidad y de genuino, debido que su formación médica, posiblemente no se apoyaba en este tipo de visión de la salud. Por tanto, contrastarlo con otras miradas de cosmovisiones de la salud desde otros autores, encontramos a Restrepo, Luis C. (1996), quien reflexiona en su artículo *El derecho a la salud*, sobre el valor de las relaciones entre los seres humanos, y su asociación a la salud.

Si bien es cierto, que el mencionado autor enfoca al amor entre las personas como una variable relevante al hablar de la salud, no es menos cierto, que se podría establecer una similitud al pensamiento y praxis del Doctor Convit, cuando siempre resaltó la esencia del valor del ser humano como el norte de sus acciones de la investigación científica, la docencia y las acciones de los programas de control integral de las endemias. En este orden de ideas, es oportuno citar un segmento de una entrevista realizada a este ilustre ser humano, en Caracas 14 de Mayo 2014 - *Vencer al bacilo y vencer al prejuicio OPS/OMS, que en uno de sus segmentos expresa textualmente lo siguiente:*

“...una noche recibí un hombre encadenado, lo traían en un camión custodiado con gente armada. Un pobre ser que lo único que tenía era lepra. Yo les pedí que lo soltaran e intenté demostrarles cómo se sentía esa persona"...En ese momento los enfermos comprendieron que tenían a su lado a una persona diferente de aquellas que les había maltratado. Fue

allí donde el Dr. Jacinto Convit descubrió que su misión era ganarse el cariño de aquella gente que sufría sin consuelo...”

Cuando analizamos estas diferentes miradas de interpretación de la trayectoria científica y humana del Doctor Jacinto Convit, podemos tejer un entramado de relaciones filosóficas y conceptuales, que él de manera genuina aplicaba. Entre estas categorías podemos subrayar las manejadas en el mundo moderno de la comunicación y relaciones interpersonales, particularmente la referida a la intersubjetividad. Esta categoría supera la visión de las relaciones subjetivas y lineales entre las personas, para enfocarse en un plano de encuentro entre visiones, conocimientos y experiencias, basado en la valoración de la esencia del ser humano, a partir de las cuales entrelaza una red de percepciones de la realidad, valorizando un reconocimiento entre diferentes actores sociales y favoreciendo el permanente aprendizaje.

Este atrevimiento en realizar una abstracción de visiones filosóficas referente a categorías como la intersubjetividad, en la praxis cotidiana de un investigador, enmarcado en una formación convencional, pareciera descontextualizado desde el rigor de un análisis científico de contenido. No obstante, nos atrevemos afirmar que en este caso se rompe esta regla de análisis pues la experiencia directa con el Doctor Convit nos acerca a establecer dicha relación.

En este orden de ideas, solo basta realizar un ejercicio de memoria y meditar: cuantas veces iniciaba una conversación donde en primer lugar se salía del escritorio para colocarse de frente y con una postura (lenguaje) corporal, con la mirada siempre fija hacia nosotros, receptores de su interlocución, generaba algunas reflexiones de entrada, tales como, “...He estado pensando sobre un proyecto xxx y quería hablar con usted para ver que piensa al respecto?¿Usted piensa que podemos realizarlo, que opina?...” Obviamente la riqueza del proceso del encuentro/conversación, se fundamentaba en la capacidad de interactuar y contar con

argumentos/contenidos sólidos para alimentar o no, la aceptación de la propuesta original.

Para cerrar esta sección de análisis/discusión, nos referiremos a otra categoría utilizada de manera cotidiana por el Doctor Jacinto Convit “...No hay enfermedades sino enfermos...” la cual utilizaba al tratar de profundizar e interpretar, la predisposición y respuesta de cada individuo frente al proceso morboso que padecía. En este sentido y de manera genuina, establecía una diversidad de vínculos condicionantes que podían determinar el comportamiento del proceso mórbido objeto de estudio. Ejemplo de esto podemos citar entre sus reflexiones: “... podría deberse a la respuesta inmunitaria individual; formas y expectativas particulares de vida; o bien, condiciones socio-sanitarias del entorno donde hace vida el enfermo; lo cual, puede incidir en la aparición, comportamiento y pronóstico de la afección...”

En el análisis e interpretación de esta genuina cosmovisión cotidiana del Doctor Convit, encontramos estrechos vínculos con el planteamiento señalado por el Psicólogo Clínico Peñuela, M. (2010), en su documento *Una visión humanista sobre el campo de la salud*, donde destaca que:

Durante siglos, las propias condiciones de salud-enfermedad se han contextualizado en torno a un proceso ideológico; el sabernos sanos o enfermos se vincula con la idea de estar en el mundo. Esto no implica que perdamos de vista el origen orgánico de la enfermedad, ¡los organismos patógenos existen!; sin embargo, lo realmente significativo reside en el cómo significamos la enfermedad y actuamos frente a ella. (p.265).

Con dicho planteamiento, podemos reafirmar que los preceptos establecidos por el Doctor Convit en su praxis cotidiana asistencial/integral para la atención de los enfermos, siempre estuvo sólidamente vinculado al estudio y control del padecimiento, a fin de investigar el posible origen multifactorial de la afección, así como, incluir en su adecuada intervención, la participación intersectorial local/nacional. En este sentido, su accionar profesional tiene vigencia en el presente y nos señala la importancia, del doble reto que tiene el trabajador en salud que permita promover en el paciente, la motivación, conciencia de autocuidado y

participación en el control/resolución de su enfermedad; y de manera paralela, transformarse en participante activo del desarrollo de una nueva cultura científica sustentada en evidencias y que profundice sus acciones hacia una praxis cónsona con la realidad socio-cultural existente en las comunidades asistidas.

## CONCLUSIONES

A la luz de los hallazgos disertados en la indagación a profundidad de la trayectoria profesional del doctor Jacinto Convit y valorados bajo una mirada paradigmática humanista, podemos inferir que nos ha dejado un legado de aprendizajes, inscritos en su dilatada experiencia acumulada de forma holística y multidisciplinar, motivado por la búsqueda incesante de respuestas a la problemática de las diferentes endemias. Es así como, guiado por su cosmovisión genuina del accionar en salud, desde el inicio de su actividad asistencial en 1938, abarcó componentes claves enmarcados en lo: preventivo-asistencial-educativo-investigativo y transversados por un enfoque humanista con acercamiento a la esencia del ser humano, desde una consulta, el trajinar en las comunidades, o bien desde su laboratorio.

La estrategia de trabajo integrada desde una visión multidisciplinar, desarrollada por el Doctor Convit durante su trayectoria de vida, generó un impacto altamente positivo en el control de las endemias bajo su responsabilidad. Inicialmente, en la lucha y control de la lepra, que promovieron la desmitificación de este flagelo cargado de mitologías bíblicas; búsqueda, tratamiento humanizado y control ambulatorio de los casos; así como, la educación Paciente/familia y reinserción social de los enfermos controlados. Apoyados en esta experiencia y de manera progresiva, hizo posible su replicación en el control de otras endemias (Leishmaniasis, Oncocercosis, entre otras). Igualmente, de manera intersectorial, intervino con su equipo de trabajo para brindar/recibir el apoyo técnico nacional/internacional, a través de la participación con Entes Gubernamentales (OG) y no Gubernamentales (ONG), en el asesoramiento, formación de personal y gestión de programas.

El Doctor Convit consideró el componente educativo y humanizado de vital importancia en la lucha y control de las endemias. Evidencia de esto, fue su primera publicación realizada en 1941, titulada *El mal de Hansen. Algunas nociones que el público debe conocer sobre la lepra*, la cual tenía por finalidad difundir el conocimiento de dicha afección, en una población que vivía en dramáticas condiciones sanitarias; así como, resaltar la importancia que tiene el médico epidemiólogo en realizar educación sanitaria para el control epidemiológico de cualquier enfermedad, para ese momento histórico.

Este componente estratégico de forma progresiva lo profundizó e institucionalizó, apoyado con expertos en la materia, de manera que respondiesen a la dinámica social y de salud, cónsona con el momento histórico transitado. Cabe destacar que, producto de su esfuerzo incansable de educar a los individuos y comunidades, de manera genuina trasladó los espacios educativos cerrados hacia aulas abiertas, ubicadas en los escenarios naturales que transitaba, durante sus visitas a las comunidades; todo lo cual, le permitía el diálogo ameno, sencillo y enriquecedor con las personas que interactuaba.

De lo consensuado, podemos inferir que tuvimos la oportunidad de compartir con un *valioso ser humano de avanzada*, protagonista genuino de su cosmovisión holística de prestación de servicios de atención en salud, cimentada en la ética, humanismo y conciencia social, la cual fue creando de manera silenciosa pero oportuna para conocer y analizar en el campo, (una determinada realidad social y de salud). De esta manera, generar y presentar propuestas consensuadas para el desarrollo de líneas de acción, en beneficio del fortalecimiento del programa integral de control de endemias que, a su vez, contribuyesen en la superación de estos padecimientos e impactar en el desarrollo integral del país.

Al cierre del presente artículo, ratificamos nuestro deseo de rendir homenaje y tributo a un científico, profundamente humano cargado de *bien merecidos epítetos*, producto de su sabia y científica actuación, por más de 70 años de trabajo ininterrumpido y en beneficio de las personas con reconocidas

vulnerabilidades sociales, residentes en comunidades con importantes inequidades y desigualdades sanitarias y geográficas. Igualmente, proponemos que más allá de conformarnos con la simple asimilación del contenido de este documento, sea posible propiciar de manera general la estimulación del lector, especialmente trabajadores de la salud, a la redefinición de los saberes, que contribuyan a un mayor desarrollo integral en la prestación de servicios, desde una mirada de la promoción en salud, cuyo núcleo principal sea la calidad de vida y el desarrollo humano integral de una población.

## REFERENCIAS

- AVILA, B., J.L. (1996). *“Imagen y Huella de Jacinto Convit. Editado por la Gerencia de asuntos públicos de Intevep, S.A”*. Centro de investigación y apoyo tecnológico, filial de Petróleos de Venezuela, S.A. Caracas, Venezuela. ISBN: 980-259-759-7
- BORGES R. & GARCÍA B. (2004). *“Jacinto Convit: Un hombre de dos siglos”*. Revista Comunidad y Salud. Universidad de Carabobo Vol2 N°2 2004
- COHEN, L. Y MANION, L. (1990). *“Métodos de investigación educativa”*. Madrid: La Muralla: ISBN 10: 8471335654 ISBN 13: 9788471335654
- DENZIN, N.K. (1970). *“Sociological Methods. A Sourcebook”*. Chicago, IL: Aldine Publishing Company.
- GARCÍA G. BAILDE. GUEVARA DE S. MILADY. (2014). *“Formación de promotores sociales en salud en Venezuela. Una experiencia enmarcada en un enfoque ecosistémico”*. Revista Salud y Comunidad. Universidad de Carabobo. Supl. 2014; 12 (2), Jul-Dic
- RESTREPO LUIS C. (1996). *“El Derecho a la Ternura. Arango editores Santa Fe Bogotá Colombia”*. Novena edición.
- SÁNCHEZ MARTÍN. (2014). *“Jacinto Convit: más que un Prócer de la salud, un ciudadano ejemplar”*. boletín de malariología y salud ambiental LIV(1):114.
- ARIAS, V. MARÍA, V. (2000). *“La Triangulación Metodológica: sus principios, alcances y limitaciones Investigación y Educación en Enfermería”*. Dialnet ISSN 0120-5307, ISSN-

e 2216-0280, Vol. 18, N° 1 (pp.13-26). Disponible en línea: [Dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?co...](http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?co...)

FREIRE PAULO. (1970). "Pedagogía del Oprimido". (pp.1-170). Disponible en Línea: <http://pdfhumanidades.com/sites/default/files/apuntes/Freire%20%2C%20%20Pedagogia%20del%20Oprimido.pdf>

PEÑUELA-OLAYA, MARCO A. (2010). Una visión humanista sobre el campo de la salud. *Perinatología y Reproducción Humana. Artículo de Educación* Vol. 24. N° 4 (pp. 265-271). Disponible en línea: [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx).

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central de Venezuela (U.C.V), en la gerencia del Instituto de Biomedicina, para compartir nuestra historia de vida con el doctor Jacinto Convit, en el marco de la celebración de 55° Aniversario de su fundación. A la Revista Tribuna del Investigador por invitarnos a publicar la conferencia: *Jacinto Convit: vida, obra y Accionar para el control de Las endemias*, julio 2019.

# Educación médica de calidad utilizando tecnologías de información y comunicación: SOS Telemedicina-UCV

## 55 aniversario del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”

Jesús Francisco Velásquez Rojas<sup>1</sup>  
jevella@hotmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-5011-9702>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

### RESUMEN

La creación del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” en el año 1965, coincide con una nueva etapa de estudios médicos en el Hospital Vargas de Caracas al crearse la Escuela de Medicina “José María Vargas”. El diseño inicial del plan de estudios fue por convenios con la Universidad de Stanford para lograr mayor calidad del egresado utilizando modernas estrategias docentes. A pesar de que en la misma fecha surgen las TIC y el internet, señaladas por la UNESCO como herramientas de aprendizaje para crear, diseminar y aplicar los conocimientos para el desarrollo humano, no fueron incluidas entre esas estrategias. El desarrollo actual de las TIC y la insuficiencia de docentes, debe conducir a un cambio paradigmático curricular e incluir a las TIC como herramientas educacionales y una actualización de prácticas y contenidos, de acuerdo a la nueva sociedad del conocimiento y a los retos que enfrenta la salud de las poblaciones en el siglo XXI. La Facultad de Medicina de la UCV, a través del programa SOS Telemedicina, ha creado una infraestructura con la confluencia de factores pedagógicos, tecnológicos, médicos y comunicacionales, para uso de TIC en el campo de la didáctica de los saberes médicos, con el fin de mantener la calidad de la educación médica de esta casa de estudios.

**Palabras Clave:** TIC en educación médica; Calidad de la educación; Cursos MOOC; Proyecto ECHO; SOS Telemedicina.

### QUALITY OF MEDICAL EDUCATION USING INFORMATION AND COMMUNICATION TECHNOLOGY: SOS TELEMEDICINA-UCV 54th ANIVERSARY OF THE INSTITUTE OF BIOMEDICINE “DR. JACINTO CONVIT”

### ABSTRACT

The establishment of the Institute of Biomedicine Dr. Jacinto Convit in 1965, coincided with a new stage in the medical studies at the Hospital Vargas in Caracas, with the creation of the School of Medicine Jose Maria Vargas. The initial plans were design through an agreement with the University of Stanford with the aim to improve the quality of the graduates, through modern teaching

strategies. Even though at the same time TIC and internet appeared, mentioned by the UNESCO as a teaching tool to create, disseminate and to apply knowledge to the developing human, they were not included in the strategies. The recent development of TIC and the lack of teachers, must lead to a paradigmatic change in the curriculum where TIC must be included as a teaching tool, and an actualization of the fieldwork and contents according to the new society knowledge and the challenges facing public health in the XXI century. The Faculty of Medicine of the UCV through its program of SOS Telemedicine, has developed an infrastructure with the confluence of factors from pedagogical, technological, medical staff and communication, for the use of TIC in the didactic medical knowledge, with the aim of maintaining the quality of medical education at our school.

**Keywords:** TIC in Education; Quality of Education; MOOC Course; ECHO Project; SOS Telemedicina.

## INTRODUCCIÓN

La fecha aniversario del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, debe ser recordada por la comunidad médica nacional y personal de salud docente asistencial del Hospital Vargas de Caracas (HVC) y de la Universidad Central de Venezuela (UCV), además, como un antecedente de la creación de la Escuela de Medicina “José María Vargas” y la permanencia de dicho hospital como lo que era su función desde el año 1895, cuando fue establecido como centro para la enseñanza médica de la Facultad de Medicina de la UCV (Bracho, 2008).

Y es que al ser aprobado por el Consejo Universitario de la UCV el 16 de junio de 1965, a solicitud de la Facultad de Medicina la creación de lo que se llamó entonces “Centro de Investigaciones Dermatológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela”, origen del Instituto que celebra hoy su 55 aniversario, con adscripción del Servicio de Dermatología del HVC, se disipaban las dudas de lo que se discutía para el momento, sobre el destino del ya viejo, Hospital Vargas de Caracas (UCV, 2017).

A pesar de que desde el año 1985, como ya se ha dicho, el HVC era el Centro de la docencia y formación de los profesionales médicos que egresaban de la UCV; a raíz del inicio de funciones en el año 1958 del Hospital Universitario de Caracas (HUC) y demás edificaciones de la Facultad de Medicina en la Ciudad Universitaria, se inició el traslado de cátedras, profesores y hasta de la categoría docente del HVC, al recién construido y

puesto en funcionamiento centro asistencial (Bracho, 2008).

Algunos emergentes pero visionarios profesores, entre otros el Dr. Jacinto Convit, alzaron su voz de alerta ante el exabrupto que se proponía como destino final de la noble institución universitaria, para lograr finalmente que, el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social y la UCV, acordaran mantener la presencia de estudiantes de medicina para su formación práctica profesional en el Hospital Vargas de Caracas durante los dos últimos bienios, los años 1958 y 1959, “...reconociendo el valor docente del viejo Hospital y el deseo de enseñar de los que en él se habían quedado” (Bracho, 2008).

Justamente fueron esas dos cohortes, quienes egresaron los años 1964 y 1965, a la cual pertenezco, las últimas en completar su formación clínica en el Hospital Vargas de Caracas, antes del nacimiento de la Escuela de Medicina “José María Vargas” (EMJMV), dependiente de la UCV, hecho que ocurrió el 24 de septiembre de 1965 (Velasquez, 2008).

Se hace esta referencia porque la formación de los estudiantes de la EMJMV, se programó inicialmente con un currículo paralelo al que seguían los alumnos que cursaban en el HUC, luego fue Escuela de Medicina “Luis Razetti”, sin embargo, entre los profesores predominaba la tendencia a introducir cambios en la estructura curricular, a objeto de lograr la más alta calidad de la enseñanza, aplicando modernas estrategias docentes puestas en práctica en otras Escuelas de Medicina del exterior.

Se hizo contacto con profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, de cuyas reuniones e intercambios, “...se dio nacimiento a los más promisoros proyectos educacionales, quedando de paso establecida una estrecha relación con la Escuela Médica californiana” (Montbrun, 1964).

Con el transcurrir del tiempo lamentablemente esta relación se perdió, y se califica de lamentable, porque como se sabe, los QS World University Rankings que evalúa 3.000 universidades y considera casi 9.000 universidades en todo el mundo para seleccionar las primeras 400, en el año 2018-19, posiciona a la Universidad de Stanford en el segundo lugar después del Instituto Tecnológico de Massachusetts. La UCV ocupa el lugar 751 (QS World University Rankings, 2019).

## **Las TIC, recurso innovador en educación**

El final de siglo XX y lo que va del siglo XXI se ha caracterizado por el enorme desarrollo que han tenido las Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC), y en especial, los avances en la tecnología del computador y de internet, puesto a disposición de los usuarios a partir del año 1969, inicialmente, como canal de información en las áreas sociales, culturales y políticas; posteriormente propuesto por la UNESCO como un mecanismo para crear, disseminar y aplicar los conocimientos necesarios para el desarrollo humano. Se empezó a hablar entonces de la Sociedad de la información y del conocimiento (UNESCO, 2005).

Desde ese momento, internet se convirtió en la más poderosa herramienta de interconexión en el mundo en todas las áreas. De modo que al día de hoy, prácticamente no hay un solo ámbito de la vida humana que no se haya visto impactada por este desarrollo: la salud, la educación, las finanzas, los mercados laborales, las comunicaciones, los gobiernos, la productividad industrial, etc. El conocimiento y la información se multiplican más rápido que nunca antes y se distribuye de manera equitativa e instantánea para todo el mundo.

Los hallazgos de la ciencia, nuevos medicamentos y soluciones, descubrimientos e innovaciones, así como las crisis económicas, los desastres, las infecciones, nuevas armas y en general cualquier evento o suceso mundial, se conoce casi en el momento en que se está sucediendo (Castells, 2014).

Para el año 2013, de 7.700 millones de habitantes en todo el planeta, internet era usado por 7000 millones de habitantes y según el estudio publicado por Hilbert, el 95 % de toda la información existente en el planeta está digitalizada y en su mayor parte accesible en internet y otras redes informáticas (Hilbert y López, 2011).

Dada la importancia de los señalados avances y las ventajas que estas tecnologías podían tener para el desarrollo de los pueblos, en 1998 la UNESCO tituló su Informe Mundial sobre la Educación: "*Los docentes y la enseñanza en un mundo en mutación*". En él se describe el profundo impacto de las TIC en los métodos convencionales de enseñanza y de aprendizaje,

augurando también la transformación del proceso de enseñanza-aprendizaje y la forma en que docentes y alumnos acceden al conocimiento y la información (UNESCO, 1998).

Allí se señala, entre otras cosas, que con la incorporación de estas tecnologías:

- 1.- El énfasis de la profesión docente cambia desde un enfoque centrado en el profesor y basado en clases magistrales, hacia una formación centrada principalmente en el alumno, dentro de un entorno interactivo de aprendizaje.
- 2.- Las TIC en la docencia son efectivamente un elemento clave para lograr reformas educativas profundas y de amplio alcance.
- 3.- Las instituciones de educación docente deberán optar entre asumir un papel de liderazgo en la transformación de la educación, o bien quedar rezagadas en el camino del incesante cambio tecnológico.
- 4.- Para que la educación pueda explotar al máximo los beneficios de las TIC en el proceso de aprendizaje, es esencial que tanto los futuros docentes como los docentes en actividad sepan utilizar estas herramientas.

En mayo de 2011, se presentaron los resultados del Encuentro Preparatorio Regional de las Naciones Unidas celebrado en Buenos Aires, en el documento titulado "*Educación de calidad en la era digital: una oportunidad de cooperación para la UNESCO en América Latina y el Caribe*", así como el seminario internacional denominado "*Impacto de las tecnologías de la información y las comunicaciones (TIC) en la educación*".

## **Impacto de las tecnologías de la información y las comunicaciones (TIC) en la educación**

En dichos documentos se reconoce que la revolución digital es irreversible y que los gobiernos deben ser alentados a formular políticas con el fin de incorporar las TIC de manera más integral en los planes curriculares y la recomendación a los gobiernos de la región en la implementación de programas e iniciativas para el uso educativo de las TIC, recogidos en su versión 3 en documento publicado en Francia en 2019 (UNESCO, 2019).

Sin duda, este desarrollo de las TIC y la creciente producción y divulgación de conocimientos en salud, han impactado profundamente a la educación médica

en todos sus niveles: la de pregrado, postgrado y en el desarrollo profesional continuo.

Las Facultades de Medicina, para mantener los estándares de calidad de sus egresados, deben desarrollar nuevas metodologías de la enseñanza que complementen la tradicional clase magistral, el laboratorio y la rotación clínica. Ello implica que deben realizarse cambios curriculares profundos que garanticen a los estudiantes de pregrado y postgrado, la obtención de capacidades de autoformación para acceder a la mejor información disponible y a las mejores prácticas, en las que se incluyan metodologías y estrategias educativas basadas en el uso de las TIC, la simulación, la medicina basada en la evidencia y el aprendizaje basado en la solución de problemas médicos, a través de las cuales se puede alcanzar lo que son tendencias mundiales para la educación de los médicos: la globalización, la interdisciplinariedad y el fortalecimiento curricular, en áreas como la investigación, formación socio humanística, ciencias básicas y salud.

Los egresados de pregrado y de postgrado, para mantener y mejorar sus competencias clínicas, deben asumir como un hábito de vida, la conjunción de la práctica médica con la formación continua. Sus responsabilidades y capacidades morales y éticas para mantenerse informado, se demuestran a través del autoaprendizaje permanente. En este sentido, las TIC son herramientas fundamentales para el logro de tales objetivos, al permitir la comunicación entre universidades y hospitales nacionales o de otras latitudes, con profesores, otros egresados y sociedades o asociaciones médicas de diversos países, para compartir conocimientos y experiencias que refuercen la calidad del ejercicio médico.

### ***SOS Telemedicina – UCV, al servicio de la docencia de calidad***

Los argumentos que se han expuesto en el aparte anterior, son obligantes a pensar en un cambio paradigmático en cuanto a la educación médica actual. Si se quiere mantener una educación y formación médica de calidad, es necesario incorporar las TIC como herramienta educacional y una actualización

de prácticas y contenido, de acuerdo a la nueva sociedad del conocimiento y a los retos que enfrenta la salud de las poblaciones en el siglo XXI.

Sumado a esto se agrega una nueva realidad, en Venezuela. Producto de una confluencia de factores, 40% de los egresados de las universidades nacionales en la última década, ha emigrado. Un porcentaje similar de profesores ha renunciado a la docencia o se han jubilado, comprometiendo la formación de los nuevos profesionales de calidad que el país necesita (Revista Venezolana, 2018). Esta situación, requiere implementar nuevas prácticas educativas con TIC, que nos permitan tener a disposición los mejores docentes, independientemente del lugar donde ellos se encuentren. Con la experiencia adquirida en SOS Telemedicina, se aprecia que se está en el momento oportuno para incorporar estas herramientas en el currículo médico.

Las adversidades que se viven hoy pueden ser mayores, e incluso por falta de servicios básicos, transporte o eventos inesperados que dificulten el traslado de profesores y estudiantes a sus aulas habituales de formación, las TIC son una alternativa para la prosecución de la actividad académica.

La Universidad Central de Venezuela, viene trabajando, desde hace más de quince años, en la incorporación de las TIC a la gestión en educación en salud, a través del Programa SOS Telemedicina, de la Facultad de Medicina de la UCV. El programa, propicia la confluencia de factores pedagógicos, tecnológicos, médicos y comunicacionales, en un amplio espectro de estrategias para uso de TIC en el campo de la didáctica de los saberes médicos, con el fin de contribuir a proteger la calidad de la educación médica que siempre ha promovido esta casa de estudios (UCV, 2020).

SOS Telemedicina, propone a través de TIC, mejorar la capacidad resolutoria asistencial de médicos de atención primaria, educar a distancia, transferir tecnologías a las regiones, desarrollar capacidades y evaluar los beneficios de la Telemedicina en el país (CEPAL, 2013).

Desde el año 2009, se ha logrado demostrar que con el compromiso y la participación de los diferentes

actores sociales y el uso adecuado de las TIC, la telemedicina se constituye como una alternativa, y en muchos casos la única opción, para ofrecer acompañamiento al médico general y especializado a distancia; así como un excelente medio de educación médica continua, que apoya a los profesionales de la salud en su tarea de proporcionar una atención en salud de calidad, oportuna y con equidad en beneficio de los pacientes (CEPAL, 2013).

En ese sentido durante ese lapso, se han desarrollado numerosos contenidos, señalados en la Tabla 1, dirigidos al personal de salud y a la comunidad, incluidos en portales web, páginas web temáticas, libros y revistas digitales en línea, de acceso gratuito a través de <http://sosteleducacion.ucv.ve>. Estos contenidos impactan directamente las funciones de docencia, investigación y extensión de la UCV.

**Tabla 1.** Contenidos producidos en SOS Telemedicina. <http://sosteleducacion.ucv.ve>

PERSONAL DE SALUD	COMUNIDAD
Revista digital VITAE	Videos educativos
Conferencias magistrales	Portal Sana Sana Salud para todos
Video clases	Hablemos de...
Video conferencias	Micros informativos
Video tutoriales	Cápsulas de salud
Cursos MOOC	
<u>Programa ECHO</u>	

En esta publicación, se tratará solo sobre Cursos MOOC y Programa ECHO, como una muestra de gran impacto para la educación de calidad con TIC, que adelanta el programa SOS Telemedicina de la Facultad de Medicina de la UCV.

## Cursos MOOC

Con las Tecnologías de información y comunicación, y apoyados en la metodología de Cursos MOOC, la plataforma educativa SOS Telemedicina cursos en línea, pone a disposición del personal de salud, espacios de comunicación, información, socialización y formación permanente, ofreciendo la posibilidad de certificar conocimientos a través de la UCV.

### Metodología

Los Cursos MOOC, por sus siglas en inglés *Massive Open Online Course*, son una alternativa de enseñanza y aprendizaje a distancia, en educación médica, que ofrece la posibilidad de capacitar al personal de salud en contenidos útiles y pertinentes, mediante cursos abiertos, masivos, y en línea, completamente gratuitos. Tiene las siguientes características (Cano y Meneses, 2014):

**Masivo.** La cantidad de participantes es indeterminada y se requieren metodologías distintas a las tradicionales para atender las altas demandas de formación.

**Abierto.** El resguardo de los contenidos desarrollados se mantiene en función del uso de licencias para cada recurso, sean originales o tomados de otros autores. Cobra vigencia los recursos educativos abiertos en esta metodología.

**On Line.** Se aprovechan los recursos que ofrecen los servicios de internet. Se diseñan las propuestas considerando una audiencia diversa. Los tiempos de conexión son variables.

En su estructura se incluyen video clases, desarrolladas por profesores de reconocida competencia, con contenidos escritos y referencias bibliográficas, video tutoriales, y presentaciones de las ponencias completamente descargables y accesibles al usuario en cualquier momento. El participante obtiene la certificación emitida por el Programa SOS Telemedicina.

La metodología establecida para la producción de cada curso se realiza en 8 pasos:

**Paso 1.** Definir tema-especialidad. El equipo de especialistas determina las necesidades de formación, nombra el Coordinador, y se establece: tema, especialidad, el tópico a tratar, programa y ponentes.

Paso 2. Elaborar la ficha-resumen. El coordinador determina la audiencia a la que va dirigido y en conjunto con el Coordinador educativo, define los propósitos, objetivos y competencias a desarrollar. Esta información completa la ficha-resumen para la presentación en la plataforma Web.

Paso 3. Estructurar contenidos. Es el cuerpo del curso, unidades y lecciones. Cada lección incluye una descripción breve de la misma, sus objetivos, contenido de la video clase, material de apoyo, tutoriales, glosario, referencias y evaluaciones. Los recursos de aprendizaje contemplan imágenes, videos, audios, presentaciones y documentos PDF.

Paso 4. Grabar video promocional. Video de corta duración que permite a cualquier participante que visite la plataforma SOS Telemedicina, conocer el contenido del curso.

Paso 5. Grabar video introductorio. Es el video inicial de la lección. Se señalan los contenidos a tratar, los objetivos, los materiales a revisar, las actividades y la instrucción de que al aprobar la lección puede continuar con el resto del curso.

Paso 6. Grabar video clase. Video con el contenido de cada lección de 18 minutos de duración conformada por una introducción, el desarrollo de la lección y un cierre.

Paso 7. Grabar tutorial. Si la lección lo requiere. Se elabora un guion que incluya: importancia del procedimiento a demostrar, así como el paso a paso que conlleva la ejecución del mismo.

Paso 8. Incorporar el curso a la plataforma tecnológica. Previamente, los profesores realizan una simulación para garantizar la validación de la información y las funcionalidades del curso.

La plataforma cuenta actualmente con 19 cursos con temas incluidos en los programas de estudios médicos de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Se señalan por especialidad en la Tabla 2.

Todos ellos están a la disposición del personal de salud con acceso gratuito a través de la dirección <http://sosteledicinacursos.ucv.ve>.

El resumen general de los cursantes es el siguiente:

Cursantes inscritos: 2999 registros;

Cursantes Activos: 207 registros

**Tabla 2.** Cursos realizados hasta el 01-07-2019

Ginecología y Obstetricia	8
Control prenatal	
Salud sexual y reproductiva	
Hemorragias en el embarazo	
Actualización en métodos anticonceptivos temporales	
Trastornos hipertensivos del embarazo	
Parto pretérmino	
Infecciones en el embarazo y puerperio	
Consulta prenatal para personal de enfermería	
Pediatría	7
Consejería en Lactancia Materna	
Nutrición y otras recomendaciones a la madre que amamanta	
Atención al recién nacido normal	
Vacunas - Primer curso: Generalidades, calendario y vacunas por vía oral	
Vacunas antivirales	
Vacunas antibacterianas	
Cómo resolver los problemas de la madre que amamanta	
Infectología	2
IAAS: Prevención y riesgos	
IAAS: Procedimientos y condición del paciente	
Inmunología y Oncología	1
Tecnologías de Información y comunicaciones	1
Total	19

Cursantes Reprobados: 155 registros

Cursantes que han reiniciado un curso 57 registros

### **Proyecto ECHO**

El proyecto ECHO por sus siglas en inglés, *Extension for Community Healthcare Outcomes*, es un programa innovador desarrollado en la Universidad de Nuevo México, Albuquerque-USA, para educar y dirigir el tratamiento de pacientes con patologías crónicas y complejas en áreas rurales, distantes o desatendidas.

Este proyecto se inicia en Venezuela partir del 16 de mayo, 2016, cuando en el Consejo Ejecutivo de la Universidad de Nuevo México, acuerda otorgar el derecho para llevar a cabo actividades del Proyecto ECHO en Venezuela a través del Programa SOS Telemedicina de la Facultad de Medicina de la UCV (Proyecto ECHO, 2016).

Este proyecto se desarrolla, desde diciembre de 2016, dirigido al personal de salud, manteniendo espacios de información, análisis y discusión de temas médicos a través de la presentación de casos clínicos reales y complejos como si se estuviera en una revista clínica.

### Metodología

Las sesiones de presentación de casos clínicos (Teleclínicas) son coordinadas por un médico especialista (o un equipo de especialistas) en el tema establecido previamente. Los médicos interesados en presentar y discutir casos clínicos, contactan al coordinador para programar la teleclínica.

En esa actividad, los médicos de atención primaria, residentes, especialistas, se conectan por Internet con los especialistas invitados por el coordinador y presentan casos complejos que requieren la orientación de un experto.

Se discute el caso entre los participantes y se hacen las recomendaciones.

Al cierre, uno de los especialistas hace una breve revisión del tema tratado (Didáctica)

La repetición de esta metodología genera en los equipos de salud nuevos conocimientos y competencias que les permiten tratar por sí mismos diversas patologías.

La presentación de los casos se hace de manera sencilla, en 5 minutos, a través de diapositivas que reflejan el motivo de consulta, antecedentes, conducta, evolución, plan de trabajo, incluyendo exámenes de laboratorio y otros paraclínicos de interés.

Los médicos tratantes responden las preguntas relativas a la enfermedad del paciente, y los expertos discuten y tratan los problemas relativos al tema.

A través de la tecnología y con la discusión de casos clínicos se establece un puente entre los médicos especialistas de las universidades y los médicos generales de atención primaria. Con las Teleclínicas, se persigue:

- 1.- Trasladar el conocimiento en lugar de los pacientes o aprendices.
- 2.- Democratizar el conocimiento médico.
- 3.- Ofrecer la mejor atención en salud a las personas de menos recursos.

En la tabla 3 se señala el resumen general de las teleclínicas realizadas, a las cuales se conectan cursantes de postgrado y sus profesores así como

grupos de estudiantes y especialistas que participan activamente en las reuniones realizadas.

Hasta la fecha se han realizado 53 teleclínicas. Por especialidades son:

ECHO Pediatría. Crecimiento talla baja. 26 teleclínicas, los primeros viernes de mes

ECHO Obstetricia. Embarazo de alto riesgo. 23 teleclínicas, los segundos viernes de mes

ECHO Infectología. El paciente con infecciones. 06 teleclínicas, los últimos viernes de mes.

Con el uso de la app ZOOM, descargada en computadoras, tableta o equipo androide, es posible unirse a las teleclínicas con las siguientes direcciones:

Embarazo Alto Riesgo ID:2776427786

Pediatría ID:6093459417

Infectología ID:7228505879

Las didácticas de cada caso presentado, así como la discusión generada durante la presentación son grabadas y colocadas en el canal de SOS Telemedicina con acceso libre a través del enlace <http://sosteleducacion.ucv.ve/echo/>

**Tabla 3.** Actividad general de las teleclínicas. Casos clínicos y participantes

<b>Teleclínicas ECHO</b>	
Total teleclínicas	53
Casos Clínicos	59 casos (49 presentadores)
Didácticas	44 didácticas (25 presentadores)
Embarazo de alto riesgo	21 teleclínicas – 720 participantes 27 casos clínicos - 16 didácticas
Crecimiento y Talla baja	26 teleclínicas - 1186 participantes 28 casos clínicos - 26 didácticas
Infectología	6 teleclínica - 1096 participantes 4 casos clínicos - 2 didácticas

## CONCLUSIONES

El logro de las metas de salud de los sistemas sanitarios debe contar con profesionales bien formados, actualizados y entrenados, en la asistencia, prevención y promoción de sistemas de vida saludable.

La educación médica continua (EMC) de los profesionales que conforman el equipo de salud permite optimizar la experiencia, y prestar una atención de calidad, seguridad y eficiencia a los pacientes.

SOS Telemedicina de la Universidad Central de Venezuela representa una alternativa de educación médica continua, a través del desarrollo de programas en línea con el uso de las TIC que permiten la actualización en contenidos en salud, válidos y confiables avalados por profesores y expertos universitarios.

La UCV a través de la Facultad de Medicina, gestiona permanentemente de manera permanente la innovación, utilizando las tecnologías de información y comunicación como vehículo trasmisor del conocimiento en salud.

## REFERENCIAS

- BRACHO DS. (2008). "Antecedentes históricos de la Escuela de Medicina José María Vargas". *Medicina Hoy. Revista informativa de la Facultad de Medicina de la UCV* 14:07-13.
- CANO EV, MENESES EL. (2014). "Los MOOC y la Educación Superior: la expansión del conocimiento". *Revista de curriculum y formación del profesorado* 18(1):3-12.
- CASTELLS M. (2014). "El impacto de internet en la sociedad. Una perspectiva global". [Internet]. Disponible en: <https://www.bbvaopenmind.com/articulos/el-impacto-de-internet-en-la-sociedad-una-perspectiva-global/>
- CEPAL. (2013). "SOS Telemedicina: la experiencia de la Universidad Central de Venezuela". [Internet]. Disponible en: <https://www.cepal.org/es/publicaciones/4081-sos-telemedicina-la-experiencia-la-universidad-central-venezuela>
- HILBERT M, LOPEZ P. (2011). "The World's Technological Capacity to Store, Communicate, and Compute Information". *Science* 332(6025):60-65.
- MONTBRUN F. (1964). "La Escuela de Medicina José Vargas (Folleto Divulgativo)". Caracas. Asociación para el desarrollo de la Escuela Vargas. [Multigrafiado].
- PROYECTO ECHO. (2013). "Extension for Community Healthcare Outcomes". Universidad de Nuevo México, Albuquerque-USA. [Internet]. Disponible en: <https://echo.unm.edu/>
- PROYECTO ECHO. (2016). "Extension for Community Healthcare Outcomes". Universidad de Nuevo México, Albuquerque-USA. Contrato de términos de uso de la propiedad intelectual de project echo®.
- QS WORLD UNIVERSITY RANKINGS. (2019). "Las mejores Universidades". [Internet]. Disponible en: <https://www.topuniversities.com/university-rankings/world-university-rankings/2019>.
- REVISTA VENEZOLANA. (2018). "Deserción de estudiantes y migración de profesores: El drama de las universidades en Venezuela". [Internet]. Disponible en: <https://www.revistavenezolana.com/2018/06/desercion-de-estudiantes-y-migracion-de-profesores-el-drama-de-las-universidades-en-venezuela/>
- UCV. (2017). "Reseña histórica del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit". [Internet]. Disponible en: <http://www.ucv.ve/organizacion/facultades/facultad-de-medicina/institutos/biomedicina/organizacion/resena-historica>
- UCV. (2020). "Programa SOS Telemedicina para Venezuela". [Internet]. Disponible en: <http://www.ucv.ve>
- UCV. (2020). "Cursos en línea". [Internet]. Disponible en: <http://sosteleducacion.ucv.ve/cursosenlinea>
- UCV. (2020). "Proyecto ECHO". [Internet]. Disponible en: <http://sosteleducacion.ucv.ve/echo/>
- UNESCO. (2005). "Hacia las sociedades del conocimiento. Informe mundial". Ediciones UNESCO. Paris 244p. [Internet]. Disponible en: <http://www.unesco.org/publications>
- UNESCO. (1998). "Informe mundial sobre la educación 1998: Los docentes y la enseñanza en un mundo en mutación". Ediciones UNESCO. Madrid 174p. [Internet]. Disponible en: <https://www.urbe.edu/UDWLibrary/InfoBook.do?id=8533>
- UNESCO. (2019). "Marco de competencias de los docentes en materia de TIC". Ediciones UNESCO. Francia 174p [Internet]. Disponible en: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000371024>
- VELASQUEZ J. (2008). "Escuela de Medicina José María Vargas". *Medicina Hoy. Revista Informativa de la Facultad de Medicina de la UCV* 14:15-20.

# Dermatología del nuevo milenio: ¿Futuro o ya está aquí?

Zulay Rivera Pineda<sup>1</sup>  
 drazulayrivera@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-1278-6691>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad  
 Central de Venezuela.  
 Unidad Médico Estética Laser UNIMEL.  
 Caracas, Venezuela.

## RESUMEN

Hablar de la Dermatología del nuevo milenio, es hablar de los cambios generacionales que ha vivido la humanidad, pues la medicina se ha ido adaptando a nuevas enfermedades, su manejo y evolución. Al mismo tiempo las enfermedades dermatológicas que siempre han estado presentes a lo largo de todos estos años, también se presentan hoy, pero con patrones clínicos diferentes porque ocurren en humanos diferentes, en humanos del nuevo milenio. En este trabajo revisaremos los cambios transcendentales en el desarrollo de una consulta dermatológica, los avances tecnológicos y sus aplicaciones en medicina principalmente en dermatología. Veremos como la realidad aumentada, la realidad virtual e inteligencia artificial día a día están cumpliendo un rol fundamental en la educación y práctica médica, como la llegada de las redes sociales ha revolucionado la historia de la consulta, el target de los pacientes y la modificación de los canales de comunicación e información a nuestros pacientes. Las redes sociales tienen como pilar fundamental la transmisión de información estimulando las emociones de los seguidores o usuarios, que al final de la cascada serán nuestros pacientes, y es que las emociones juegan un rol importante en la expresión de lesiones dermatológicas de diferentes patologías y cómo modificando los escenarios sensoriales la experiencia de una consulta o cirugía puede ser completamente diferente.

**Palabras Clave:** dermatología del nuevo milenio; redes sociales; nuevas tecnologías; teledermatología; factores emocionales.

## DERMATOLOGY OF THE NEW MILLENNIUM: FUTURE OR IS ALREADY HERE?

### ABSTRACT

Talking about Dermatology of the new millennium means to speak about the generational changes that humanity has undergone, since medicine has been adapting its management and evolution to new diseases. At the same time, the diseases that have always accompanied us, dermatologists, throughout all these years still appear but with different clinical patterns because they occur in different humans, in humans of the new millennium. In this work we will review

the transcendental changes in the development of a dermatological consultation, technological advances and their applications in medicine, mainly in dermatology. We will see how the augmented reality, virtual reality and artificial intelligence day by day are fulfilling a fundamental role in medical education and practice, as the arrival of social networks has revolutionized the history of consultation, the target of patients and the modification of communication and information channels to our patients. Social networks are a fundamental pillar for transmission of information by stimulating the emotions of followers or users, which at the end of the waterfall will be our patients, and that is why emotions play an important role in the expression of dermatological lesions of different pathologies and how modifying sensory scenarios the experience of a consultation or surgery can be completely different.

**Keywords:** dermatology of the new millennium; social networks; new technologies; teledermatology; emotional factors.

## INTRODUCCIÓN

La atención médica en especial en el área de la dermatología se ha ido adaptando a la nueva era digital, poco a poco con el paso del tiempo cada día aumenta el uso de herramientas o aplicaciones, que permiten visualizar el mundo real a través de dispositivos tecnológicos con información gráfica precisa, ganando aceptación y terreno en el campo de la medicina, no solo para ser aplicadas en el área educativa si no también durante la práctica médica, enfatizando que el pilar fundamental de la medicina moderna no es aprender a curar si no a evitar que las personas se enfermen, obligando a todos a un cambio transcendental de paradigmas y dar paso a la dermatología del nuevo milenio, de la nueva era.

### **Cambios generacionales**

La humanidad ha sido clasificada por generaciones, las cuales están debidamente acotadas e identificadas, lo que ha permitido conocer y establecer los límites generacionales, para los investigadores en sociología y antropología, de cómo reaccionan o interactúan las distintas generaciones con los cambios sociales, económicos y tecnológicos. Sin embargo, algo mucho más importante ha sido el estudio de las nuevas patologías generacionales e incluso la forma de cómo han variado en el tiempo las patologías ya conocidas, tanto en la forma como se evalúan, diagnostican y se presentan en cada una

de las generaciones.

Hoy en día los dermatólogos están inmersos en un nuevo concepto de salud, de factores de riesgo que han cambiado, porque también han cambiado la forma de relacionarse los pacientes y sus actividades diarias (Wollina, 2008). En el año 2020 la mayoría de los médicos pertenecen a la generación X, un porcentaje a la Baby Boomers y un porcentaje a la generación Millennial, lo que ha implicado que estas dos primeras generaciones debieron o deben aprender a migrar de lo analógico a lo digital, tener una mayor adaptación a los cambios y en especial a los cambios tecnológicos, con el uso exponencial de más teléfonos inteligentes, apps y software actualizados, en cambio los de la generación millennial quienes son los nacidos en la era digital se enfocan más en la inmediatez. Muchos estudios se han enfocado en conocer el perfil del estudiante de medicina el cual ha ido cambiando en el tiempo. Por ejemplo, en un estudio en el cual participaron 50 residentes, se demostró que la mitad de los mismos estaban satisfechos con el programa de residencia. Sin embargo, la insatisfacción alcanzó el 40% en el volumen quirúrgico y el 80% en la tutoría. El estudio reportó que el 62% de los residentes no se sienten confiados en realizar cirugías, después de la residencia, por ende la mayoría cree que es necesaria una especialización; un alto porcentaje de los residentes creen que la compensación financiera disminuirá con el tiempo, pero las preocupaciones con el reembolso son bajas; y gran número de los residentes están preocupados, porque podrían herir a los pacientes, pero solo dos tercios están satisfechos de trabajar con pacientes. (Lafraia *et al.*, 2019).

### **Transformación digital**

La globalización cada día es mayor, hoy en día son más las personas que adquieren una telefonía móvil y portátiles, es increíble ver en los reportes de Hoosuite del 2019; en Venezuela de un total de 32,58 millones de habitantes el 95% son suscriptores de telefonía móvil, un 60% son usuarios de internet, el 40% son usuarios activos de las redes sociales y el 30% se conectan a sus redes sociales por medio de su telefonía móvil 2.0. Lo que nos habla de la transformación digital que va escalando y calando en

un mayor número de personas y cómo esta transformación es aceptada dentro de la población, adentrándose en la cotidianidad y en lo que antes para muchos era imposible ya hoy es una realidad. Uno de estos ejemplos, muy bien conocido, es el cambio de las consultas médicas presenciales hacia una nueva modalidad que es la consulta por video en vivo con el paciente, separado tan solo por una pantalla del computador, lo que se conoce como la “Tele dermatología”. Esta modalidad se ha incorporado como una de las formas, de poder acercarse y atender a los pacientes, siendo cada vez más aceptadas y usadas entre los dermatólogos y generando una mayor confianza para los pacientes. Un estudio publicado en el 2018 revela que en los últimos 5 años las consultas por correo electrónico u otra plataforma en línea se han duplicado, y que las mismas más que remplazar la consulta presencial representan un complemento en la atención del paciente (Fernández García *et al.*, 2017).

Actualmente en el área de la dermatología en particular, se conocen tres entidades de las consultas en línea, la teledermatología en tiempo real, la teledermatología de almacenamiento y reenvío, y la que combina elementos de las dos anteriores que se conoce como la teledermatología híbrida. Habiendo extensiones como la teledermatoscopia, la teledermatopatología o telecitología. Convirtiendo así la comunicación en línea en una modalidad útil y necesaria para nuestra era, con un crecimiento exponencial pero también con muchas inquietudes acerca de si los diagnósticos son acertados y si los pacientes se sienten tranquilos y a gusto con la consulta, lo cual fue corroborado en diversos estudios demostrando que si existe una buena satisfacción del paciente y concordancia diagnóstica de la teledermatología en comparación con las consultas cara a cara. La teledermatología puede ser una herramienta eficaz de triaje, reduciendo los tiempos de derivación, incluso en neoplasias malignas cutáneas, especialmente en combinación con la teledermatoscopia. Si bien la teledermatología implica clásicamente la dermatología ambulatoria, los estudios han demostrado que también puede ser una herramienta eficaz y útil en el contexto de la

dermatología hospitalaria. La teledermatología también se ha encontrado útil en el seguimiento de enfermedades crónicas de la piel (Kips *et al.*, 2019; Nicholson *et al.*, 2020; Pasquali *et al.*, 2020).

Para los dermatólogos la revolución digital no solo está implicada en la hora de la práctica médica sino también en el cambio de adquisición de conocimientos durante la carrera de medicina y sus diferentes postgrados, en donde ya están inmersa muchas de las variantes tecnológicas existentes como la realidad virtual, la realidad aumentada, la simulación e inteligencia artificial, lo que conlleva a que el médico cambie su forma de aprender y practicar, pero así mismo de ejecutar su consulta. Ya pasamos de ser un médico “sabio” por un facilitador y acompañante, que ayuda a coordinar las múltiples facetas de la atención del paciente (Fernández García *et al.*, 2017).

El desarrollo de dispositivos de realidad, permite combinar la información médica como datos de las ciencias básicas, epidemiológicos, y técnicas quirúrgicas, para ser visualizadas de forma más clara y amigables, utilizadas con gran éxito en áreas como neurocirugía, cirugía general, donde el estudiante o médico especializado puede obtener destrezas de forma más rápida, claras, y precisas otorgando seguridad al cirujano y disminuyendo las tasas de riesgo quirúrgico en vivo (Huang *et al.*, 2018). La realidad aumentada (RA) no es más que la integración de una imagen virtual en un espacio o entorno real 3D en tiempo real. Hacer que los usuarios vean un mundo que tiene un entorno real y generado por los gráficos de la computadora en una escena real. La realidad virtual (RV) ofrece a los usuarios un modelo 3D virtual real e interno para construir un mundo virtual tridimensional, aparentemente verdadero a los ojos del usuario. Recientemente, la RV también diseñó la pantalla de montaje en la cabeza, con gafas especiales para cubrir la visión circundante del usuario para lograr la situación de interacción (Huang *et al.*, 2018). Una de tantas aplicaciones de RA y RV es *Touch Surgery*, que puede ser descargada en celulares, tabletas y pc, permitiendo al médico practicar desde un ordenador, por ser un simulador computacional en tiempo real, es la primera plataforma de análisis y

almacenamiento de video con inteligencia artificial del mundo (Dickinson y Bass, 2020). El estudio de materias básicas y esenciales, como anatomía, se ha ido ajustando a los cambios tecnológicos, lo que conlleva a los dermatólogos a la necesidad de conocer y estudiar la anatomía en especial la cráneo cérvico facial de forma más tecnológica y desde la comodidad de su casa o de su consultorio, dado que el número de procedimientos y tratamientos estéticos, quirúrgica mínimamente invasivos, cobran mayor importancia. En especial porque cada día los pacientes desean una pronta recuperación y tiempos de reposo más cortos, conllevando a una disminución de los procedimientos quirúrgicos invasivos. El conocimiento exhaustivo de la anatomía, ha demostrado que disminuye el número de tasas de complicaciones durante los procedimientos; principalmente los rellenos y bioestimuladores cuya aplicación ha ido creciendo, dejando a un lado a la cirugía invasiva. Ya en algunas universidades se ha incorporado el uso de realidad virtual como en la Universidad de medicina de Taipei donde se ofrecen clases de Anatomía con Realidad Virtual con cascos HTC vive pro VR (Cheung *et al.*, 2020; Zafar y Zachar, 2020).

En estudios recientes se ha verificado que el aprendizaje a través de RV o RA es tan efectivo como el usado en las aplicaciones de tabletas. Un estudio llevado a cabo en 59 estudiantes quienes usaron RV y RA, demostró ser efectivo, y es un medio para complementar la educación en anatomía, además de promover beneficios como mayor inmersión y compromiso del alumno que cuando se usan aplicaciones por tabletas (Moro *et al.*, 2017). Otro estudio exploró, como influyen los canales de aprendizaje de cada individuo, si son más visuales o auditivos, evidenciando que la retención de conocimientos científicos en la RV es más atractiva a través del mecanismo de presencia espacial, es decir el diseño de contenido educativo debe integrar modalidades visuales, y en la RA parece ser un medio más efectivo para transmitir información auditiva a través de la vía de la presencia espacial, posiblemente debido a las mayores demandas cognitivas asociadas con las experiencias inmersivas (Huang *et al.*, 2019). La dermatología como un campo médico predominantemente

visual tiene una gran oportunidad para emplear la RA/RV con inteligencia artificial (Obagi *et al.*, 2020). Existe experiencia de cómo el uso de RV disminuye de forma significativa la ansiedad de los paciente sometidos a cirugía de Mohs, y se incrementa susatisfacción con la experiencia quirúrgica (Higgins *et al.*, 2019). También se ha desarrollado una herramienta de RA para la reconstrucción 3D de las venas subcutáneas, de la superficie de la piel de la mano, en tiempo real y proporcionar información sobre su ubicación y profundidad, con alta precisión de 0,25 mm, logrando reducir la tasa de falla y el tiempo requerido en la inyección intravenosa de las venas (Ai *et al.*, 2016).

Ya existen algoritmos basados en Inteligencia Artificial (IA) que son más precisos para reconocer lesiones dermatológicas y el monitoreo de los tratamientos. La IA es una ciencia informática que implica crear programas que tengan como objetivo reproducir conocimientos humanos y el análisis de datos complejos (Hogarty *et al.*, 2019). Las aplicaciones comúnmente analizan y clasifican imágenes, sin embargo, otras herramientas como las calculadoras de evaluación de riesgos están cada vez más disponibles (Gomolin *et al.*, 2020). Los últimos avances de IA en dermatología han sido en la detección temprana y oportuna de cáncer de piel tanto para carcinomas no melanoma y melanoma, como para lesiones benignas y premalignas, las imágenes de las lesiones dermatoscópicas o no, son divididas en píxeles individuales para el análisis. Se han usado para predecir la complejidad de la cirugía micrográfica de Mohs procesando valores numéricos en varias secuencias y extraer tendencias de datos como la clínica inicial, las dimensiones del tumor y la edad del paciente (Gomolin *et al.*, 2020; Hogarty *et al.*, 2019). El uso de herramientas de IA para evaluar calidad de vida de los pacientes con psoriasis y su clasificación al reconocer la gravedad de las lesiones por imágenes, su evolución con el tratamiento especialmente con las terapias biológicas permite predecir la efectividad de los tratamientos, a través del análisis de variables como peso, edad del paciente en la consulta inicial (Gomolin *et al.*, 2020), coexistencia de enfermedades comórbidas, permitiendo determinar

el posible diagnóstico y estadio (Hogarty *et al.*, 2019). En dermatitis atópica se plantea, que tiene un potencial como complemento, para el diagnóstico clínico e individualizado de los pacientes, ayudando a estandarizar y reducir los tiempos de evaluación de los pacientes (Hogarty *et al.*, 2019). En otras enfermedades inflamatorias, como acné. Seitè y col (2019); desarrollaron una herramienta para teléfonos inteligentes que permite la clasificación del acné, en acné no comedónico, inflamatorio e hiperpigmentación post inflamatoria. Así como para otras patologías como en dermatomiositis. También se han desarrollado análisis de imágenes de ultrasonido muscular, lo que permite diferenciar entre músculo normal, dermatomiositis, polimiositis y miositis de cuerpos de inclusión con un rango de precisión de 76,2 a 86,6% (Burlina *et al.*, 2017).

Existen aplicaciones para medir los límites precisos de las úlceras y heridas para poder precisar sus dimensiones, el progreso con el tratamiento, así como determinar la presencia de tejido de granulación, desprendimiento y necrótico, y en otras permite predecir el riesgo de desarrollar úlceras de presión (Gomolin *et al.*, 2020).

En onicomiosis se ha aplicado con gran éxito para poder realizar el diagnóstico virtual de la patología. El mismo puede ser realizado por la población general, evidenciando que existe un acercamiento estadísticamente significativo entre el diagnóstico virtual y el realizado por un dermatólogo. Algunos de estas herramientas son asequibles para usar en teléfonos inteligentes así poder ser aplicadas en el entorno social e individual.

En la edición 2019 de Viva Technology, se presentaron 3 grandes aplicaciones de la Inteligencia Artificial y RA, como la del grupo L'Oreal quienes diseñaron un Asesor Virtual del Cabello (Virtual HairAdvisor) comandado por la voz, en conjunto con la compañía Modi Face, el cual permite al usuario probar virtualmente diferentes coloraciones del pelo, y recibir en tiempo real los consejos de los profesionales. Seguida de la aplicación por parte de Vichy la cual fue co-desarrollada con dermatólogos. Esta aplicación permite analizar las características de la piel facial a través de una fotografía tipo selfie (autofoto) y

detectar 7 signos del envejecimiento como arrugas debajo de los ojos, falta de firmeza, líneas finas, falta de luminosidad, manchas oscuras, arrugas profundas y poros, esta aplicación llamada Skin Consult Alby Vichy; analiza mediante un algoritmo de IA una imagen y la coteja con su base de datos, indicándole al usuario cuales con los puntos a tratar o aspectos a mejorar, ofreciéndole asesoramiento personalizado y recomendando una serie de productos de su marca. Así mismo, la Roche-Posay, lanzo al mercado un pequeño "wearable" sin batería "My Skin Track UV", es un dispositivo de 12 mm de ancho y 6 mm de alto resistente al agua, tiene un clip para ser enganchado en la ropa o cartera, el cual mide los rayos UVA/UVB, la humedad, la polución y el polen del entorno, estos datos son enviados al celular vía bluetooth, almacena registros durante tres meses y ofrece consejos personalizados.

Otra aplicación de la IA muy útil para los dermatólogos son las app que miden el índice de radiación ultravioleta, las cuales usan la ubicación de la persona por el GPS del celular o tableta, e informa en tiempo real los niveles de radiación, y de acuerdo a su foto-tipo. Datos registrados previamente muestran información sobre el uso de protectores solares, ropa con protección y consejos del cuidado de la piel. Las diferentes aplicaciones o herramientas generadas por RA/RV e IA pueden potenciar a la población en general a tomar conciencia sobre los cuidados de su piel, seguimientos de sus patológicas dermatológicas, medir su calidad de vida, pero al mismo tiempo se podría infundir una falsa sensación de seguridad si la lesión es catalogada como benigna (Hogarty *et al.*, 2020). La IA como todo método debe estar estandarizado, pero en dermatología lamentablemente a diferencia de otras ramas de la medicina, hay muchos aspectos que no lo están, por lo que puede dar una variabilidad infinita de posibilidades (Gomolin *et al.*, 2020).

### **Evolución de la consulta dermatológica**

La intervención tecnológica en dermatología, no sólo llega hasta las aplicaciones digitales, en estos momentos la Organización Panamericana de la Salud (OPS) identifica a los Registros médicos electrónicos

(RME) como parte fundamental de la estrategia de e-Salud en las Américas. Los RME también llamado Expediente Clínico Electrónico o Historia Clínica Electrónica, que no es más que la historia clínica registrada en formato digital. Este sistema digital de historias propone una solución potencial para muchas de las problemáticas que se presentan en los sistemas de salud a nivel mundial y poder incorporar el uso de las herramientas de telemedicina, así como el manejo de la Big data, para descubrir el beneficio de las diferentes aplicaciones, el análisis avanzado de los datos, y el aprendizaje automático por los profesionales de la salud (Benke y Benke, 2018).

La cultura de Big Data abarca los sistemas ciberfísicos, la computación en la nube y el Internet de las cosas (I o T), también conocido como Industria 4.0. Estos sistemas de procesamiento de datos masivos tanto estructurados o no, a menudo implican niveles significativos de automatización de procesos (Benke y Benke, 2018).

Una de los enfoques en donde el análisis de Big Data ha sido pionero es en el análisis de datos epidemiológicos que permite reconocer por patrones y análisis de datos mediante el seguimiento de consultas en línea sobre los síntomas de la enfermedad y predecir la propagación de epidemias (Benke y Benke, 2018; Deiner *et al.*, 2016). Se ha planteado también el uso del análisis de Big Data en la medicina de precisión, donde la selección del paciente se basa en el perfil de su ADN y permite dirigir el tratamiento a seguir, aunque uno de los desafíos del uso de los datos del ADN individual son los aspectos relacionados con la privacidad genética, pues esto sigue siendo un aspecto controversial en la ética médica (Benke y Benke, 2018). Por ello los estudios a gran escala y el análisis de Big data, proporcionarán resultados genotípicos y fenotípicos más precisos que las investigaciones de casualidad (Benke y Benke, 2018).

El análisis de la Big data también puede derivar de las diferentes redes sociales existentes, es por ello que la tecnología se sigue fusionando y formando una gran red de herramientas para la actualización de los dermatólogos de la nueva era, y es que el uso de redes sociales no solo por parte de los pacientes sino

también por parte de los profesionales de la salud, de los centros médicos hospitalarios públicos y privados se han tenido que adaptar a las nuevas tendencias digitales. Las redes sociales en dermatología han modificado de forma radical la forma de informar, de dar a conocer los tratamientos, procedimientos con resultados, y cuáles son los avances en la medicina, en este caso son las redes sociales especializadas, las cuales tienen un objetivo específico que es la interacción paciente y/o profesionales, pero también tiene el poder de involucrar, educar y empoderar a los pacientes quienes se mantienen en una constante búsqueda de información de calidad y vanguardista, además en la actualidad las sociedades se van creando imágenes estereotipadas sobre tendencia de moda, belleza y salud, lo que impulsa a buscar los tratamientos o procedimientos que estén en boga en esos momentos, por ello en los últimos años ha habido un cambio de los pacientes que acuden a las consultas, con mayor número de pacientes de la generación millennial quienes son los que están más familiarizados con las redes sociales y más aun con el constante uso de tecnología móvil, la tendencia actual de tomarse una foto de perfil o selfie, con su subsiguiente modificación por filtros para lograr el cambio facial tanto de forma como textura, hasta eliminar imperfecciones cutáneas lo que conlleva a que el cliente este en constante evidencia de sus virtudes o imperfecciones, especialmente faciales y de buscar ayuda o asesoramiento con especialistas de la piel para lograr los cambios necesarios, que en algunos casos puede superar las expectativas reales, además que desean emplear tratamientos mínimamente invasivos y no realizarse procedimientos quirúrgicos definitivos (Balatsoukas *et al.*, 2015; Taberner, 2016). Es importante destacar, como lo plantea Taberner (2016), que el uso de la tecnología y redes sociales expone ciertos riesgos que deben valorarse y estar atento como son los códigos de la práctica médica, el peligro de la reputación digital y la saturación de los canales informativos de noticias o correos a los pacientes.

### **Marketing digital**

Las redes sociales llegaron para quedarse, y es hora

de aprender a usarla y manejarla, por ello muchos documentos hablan sobre la importancia que las cuentas sean completamente orgánicas, que demuestren la vida real y casos inéditos, donde el manejo de las emociones está implícito. Las emociones son y serán el pilar fundamental para la convivencia de los seres humanos, permite relacionarse y mantener una vida equilibrada. En estudios se demostró, cómo podemos influir en las percepciones sensoriales durante la práctica médica, pasando de la música para relajar y tener pacientes más tranquilos a la hora de una cirugía (Whitehouse *et al.*, 2017) así como un lugar cálido, limpio, y con aroma ambiental, forman ahora una cultura de experiencia solicitada por el paciente cuando acude a una consulta médica (Tkachenko *et al.*, 2019).

Algo esencial son las imágenes que se usan en redes sociales, y esto no es de ahora. Por ejemplo, Carr y col (2008), estudiaron como los mensajes e imágenes de

los medios de comunicación tanto los viejos como películas, televisión y música, así como los nuevos; internet, RRSS, correo electrónico, blog, etc., dan forma a las diferentes percepciones de los aspectos de la vida cotidiana de los pacientes. Por eso es de suma importancia lo que actualmente se está publicando en cada uno de los medios de comunicación porque no solo puede ser una influencia positiva sino también negativa para el público en general como perciben su imagen, vida, su trabajo hasta sus diferentes estados de ánimo, relaciones inter-personales y las comparan con las que se les presentan en los diferentes medios audiovisuales (Anixiadis *et al.*, 2019). Es por esto, que para la dermatología, siendo una rama donde las lesiones o manifestaciones de una patología se pueden ver fácilmente reflejadas en la piel; el empleo de medios visuales son de gran ayuda si se trabajan y presentan de forma adecuada, transmitiendo información confiable y científicamente comprobada.



**Figura 1.** Diferencias generacionales en el abordaje a la salud según adaptación a nuevas tecnologías.

Por último y no menos importante se encuentran las emociones que se generan a través del tacto, recordando que la piel es el órgano más grande del cuerpo humano y una de sus grandes funciones es el poder captar los estímulos sensoriales en especial del tacto, cambios de temperatura y su interrelación con las funciones afectiva/emocional que se manifiesta en la piel de muchas formas, en especial como dolor o picazón si hay injuria en la piel o resequeidad hasta incluso rubor, enrojecimiento cuando se sobresalta las personas (Butruille *et al.*, 2017), por ello no es fácil olvidar que las emociones juegan un rol esencial para la manifestación de una enfermedad, se hacen presente durante la consulta médica, y son abordadas y muy bien analizadas y aplicadas para generar contenido en el marketing digital, y cada vez más son los artículos científicos, foros, congresos donde se discute que compartir ciencia con grandes audiencias en las redes sociales es la nueva era de la educación, es la prueba de que el futuro ya llegó que requiere ser innovador e imaginativo. Esto conlleva a muchos desafíos y riesgos, pero estar depende de cada uno de nosotros estar preparado porque vale la pena.

## CONCLUSIONES

Podemos concluir, que distintas generaciones abordan la salud de diferente manera (Figura 1). Según su adaptación a las nuevas tecnologías y sus esquemas de pensamiento. Basados en su trayectoria educativa así como en diferencias en cuanto al ambiente socio-cultural en el cual se desenvuelven.

## REFERENCIAS

AI D, YANG J, FAN J, ZHAO Y, SONG X, SHEN J, SHAO L, WANG Y. (2016). "Augmented reality based real-time subcutaneous vein imaging system". *Biomed Opt Express* 7:2565.

ANIXIADIS F, WERTHEIM EH, RODGERS R, CARUANA B. (2019). "Effects of thin-ideal instagram images: The roles of appearance comparisons, internalization of the thin ideal and critical media processing". *Body Image* 31:181–190.

BALATSOUKAS P, KENNEDY CM, BUCHAN I, POWELL J, AINSWORTH J. (2015). "The role of social network technologies in online health promotion: A narrative review of theoretical and empirical factors influencing intervention effectiveness". *J Med Internet Res* 17:e141.

BENKE K, BENKE G. (2018). "Artificial intelligence and big data in public health". *Int J Environ Res Public Health* 15:2796.

BURLINA P, BILLINGS S, JOSHI N, ALBAYDA J. (2017). "Automated diagnosis of myositis from muscle ultrasound: Exploring the use of machine learning and deep learning methods". *PLoS One* 12.

BUTRUILLE L, BLOUIN A, DE JONCKHEERE J, MUR S, MARGEZ T, RAKZA T, STORME L. (2017). "Impact of skin-to-skin contact on the autonomic nervous system in the preterm infant and his mother". *Infant Behav Dev* 49:83–86.

CHEUNG CC, CECOT TS, TIPOE GL, YANG J. (2020). "Using VR-Enriched Tasks (VRETs) to Promote Active Learning in Pre-Clinical Gross Anatomy Education". *FASEB J* 34:1–1.

DEINER MS, LIETMAN TM, MCLEOD SD, CHODOSH J, PORCO TC. (2016). "Surveillance tools emerging from search engines and social media data for determining eye disease patterns". *JAMA Ophthalmol* 134:1024–1030.

DICKINSON KJ, BASS BL. (2020). "A Systematic Review of Educational Mobile-Applications (Apps) for Surgery Residents: Simulation and Beyond". *J Surg Educ* 77(5):1244-1256

FERNANDEZ GARCÍA JJ, SURBER C, BEWLEY A. (2017). "Innovation that drives your dermatological future". En: *26th European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) Congress*.

GOMOLIN A, NETCHIPOROUK E, GNIADZECKI R, LITVINOV IV. (2020). "Artificial Intelligence Applications in Dermatology: Where Do We Stand?". *Front Med* 7:100.

HIGGINS S, FEINSTEIN S, HAWKINS M, COCKBURN M, WYSONG A. (2019). "Virtual Reality to Improve the Experience of the Mohs Patient-A Prospective Interventional Study". *Dermatologic Surg* 45:1009–1018.

HOGARTY DT, MACKEY DA, HEWITT AW. (2019). "Current state and future prospects of artificial intelligence in ophthalmology: a review". *Clin Exp Ophthalmol* 47(1):128-139.

HOGARTY DT, SU JC, PHAN K, ATTI M, HOSSNY M, NAHAVANDI S, LENANE P, MOLONEY FJ, YAZDABADI A. (2020). "Artificial Intelligence in Dermatology—Where We Are and the Way to the Future: A Review". *Am J Clin Dermatol* 21:41–47.

HUANG KT, BALL C, FRANCIS J, RATAN R, BOUMIS J, FORDHAM J. (2019). "Augmented versus virtual reality in education: An exploratory study examining science knowledge retention when using augmented reality/virtual reality mobile applications". *Cyberpsychology Behav Soc Netw* 22:105–110.

HUANG TK, YANG CH, HSIEH YH, WANG JC, HUNG CC. (2018). "Augmented reality (AR) and virtual reality (VR) applied in dentistry". *Kaohsiung J Med Sci* 34(4):243-248.

KIPS J, LAMBERT J, ONGENAE K, DE SUTTER A, VERHAEGHE E. (2019). "Tele dermatology in Belgium: a pilot study". *Taylor Fr* 75:116–122.

LAFRAIA FM, HERBELLA FAM, KALLUF JR,

- SCHLOTTMANN F, PATTI MG. (2019). "Attitudes and experiences during training and professional expectations in generation-y surgical residents". *Rev Assoc Med Bras* 65:348–354.
- NICHOLSON P, MACEDO C, FULLER C, THOMAS L. (2020). "Patient satisfaction with a new skin cancer teledermatology service". *Clin Exp Dermatol* 45(6):691-698.
- CARR ER. (2008). "Quality of life for our patients: how media images and messages: influence their perceptions". *Clinical journal of oncology nursing* 12(1).
- OBAGI ZA, RUNDLE CW, DELLAVALLE RP. (2020). "Widening the scope of virtual reality and augmented reality in dermatology". *Dermatol Online J* 26(1):3.
- PASQUALI P, SONTHALI S, MORENO-RAMIREZ D, SHARMA P, AGRAWAL M, GUPTA S, KUMAR D, ARORA D. (2020). "Teledermatology and its Current Perspective". *Indian Dermatol Online J* 11:12–20.
- SEITÉ S, KHAMMARI A, BENZAQUEN M, MOYAL D, DRÉNO B. (2019). "Development and accuracy of an artificial intelligence algorithm for acne grading from smartphone photographs". *Exp Dermatol* 28:1252–1257.
- TABERNER R. (2016). "e-Dermatology: social networks and other web based tools". *Actas Dermosifiliogr* 107(2): 98-106.
- TKACHENKO E, OKHOVAT JP, MANJALY P, HUANG KP, SENNA MM, MOSTAGHIMI A. (2019). "Complementary & Alternative Medicine for Alopecia Areata: A Systematic Review". *J Am Acad Dermatol* 20;S0190-9622.
- WHITEHOUSE H, URWIN R, STABLES GI. (2017). "Music in the dermatology theatre: What do patients want to listen to?". *Br J Nurs* 26(11):588.
- WOLLINA U. (2008). "Twenty-first century lifestyle and dermatology". *Clin Dermatol* 26:1–3.
- ZAFAR S, ZACHAR JJ. (2020). "Evaluation of HoloHuman augmented reality application as a novel educational tool in dentistry". *Eur J DentEduc* 24(2):259-265.

# Tejiendo la red de la ciencia para la salud en pro de "Un mundo apropiado para los niños"

Alicia Ponte-Sucre<sup>1</sup>

aiponte@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8135-0763>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Molecular,  
Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

El diseño de herramientas de diagnóstico, epidemiológicas, preventivas y terapéuticas, primordiales en la optimización de los sistemas de salud encargados del control de las enfermedades desatendidas requieren firmemente de la investigación en ciencias de la salud. La producción de conocimiento ya sea de forma individual o en grupos, o a través de colaboraciones internacionales, garantiza el afrontar retos y diseñar recursos para solventar los problemas de salud que simbolizan las necesidades focales asociadas a las enfermedades desatendidas.

**Palabras Clave:** Objetivos de desarrollo del milenio; objetivos de desarrollo sustentable; enfermedades desatendidas; un mundo mejor para los niños; salud pública.

## WEARING THE SCIENCE NETWORK FOR HEALTH IN FAVOR OF "A WORLD APPROPRIATE FOR CHILDREN".

## ABSTRACT

The design of diagnostic, epidemiological, preventive and therapeutic tools, essential in the optimization of the health systems responsible for the control of neglected diseases, strongly require research in health sciences. The production of knowledge either individually or in groups, or through international collaborations, guarantees facing challenges and design resources to solve the health problems that symbolize the focal needs associated with neglected diseases.

**Keywords:** Millennium goals; sustainable goals; neglected diseases; a better world for children; public health.

## INTRODUCCIÓN

El 2015, fue un año crucial para los Objetivos del Milenio (ODM). Esto debido a que en septiembre de 2000 los 189 de los Estados miembros de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) firmaron la denominada “Declaración del Milenio” (Naciones Unidas, 2000). La firma de esta declaración significó un compromiso colectivo internacional que implicaba coordinar esfuerzos a nivel mundial para mejorar y optimizar el desarrollo de las naciones y de sus habitantes, poniéndose como meta el 2015. Para darle operatividad a esta declaración, en 2001, la Asamblea General de la ONU aprobó los ODM que menciono a continuación (Naciones Unidas, 2012).

1. Erradicar la pobreza extrema y el hambre.
2. Lograr la enseñanza primaria universal.
3. Promover la igualdad de género y el empoderamiento de la mujer.
4. Reducir la mortalidad de los niños menores de 5 años.
5. Mejorar la salud materna.
6. Combatir el VIH/SIDA, el paludismo y otras enfermedades.
7. Garantizar la sostenibilidad del medio ambiente.
8. Fomentar una alianza mundial para el desarrollo.

Los ideales motivadores de esta declaración, así como el establecimiento de los ODM eran fundamentales para tomar acciones, establecer metas e identificar indicadores, visionarios, pero a la vez pragmáticos y fáciles de medir con acciones concretas. Todo, con el compromiso de establecer planes que garantizaran para el 2015 "Un mundo apropiado para los niños" (Shenoda *et al.*, 2016).

Los niños y su derecho a la salud, la educación, la protección y la igualdad constituyeron los principales protagonistas de este acuerdo, tomando en cuenta que preservar los derechos de los niños es un desafío descomunal, especialmente considerando que ellos constituyen un 36 % de la población mundial, ( $2.1 \times 10^9 / 7.3 \times 10^9$  habitantes).

Tres de estos ODM se centran en el derecho a la salud, el ODM4, el ODM5 y el ODM6. Los principales dolientes (niños) de las enfermedades, particularmente de las llamadas desatendidas, habitan en los países con menor desarrollo socio-económico.

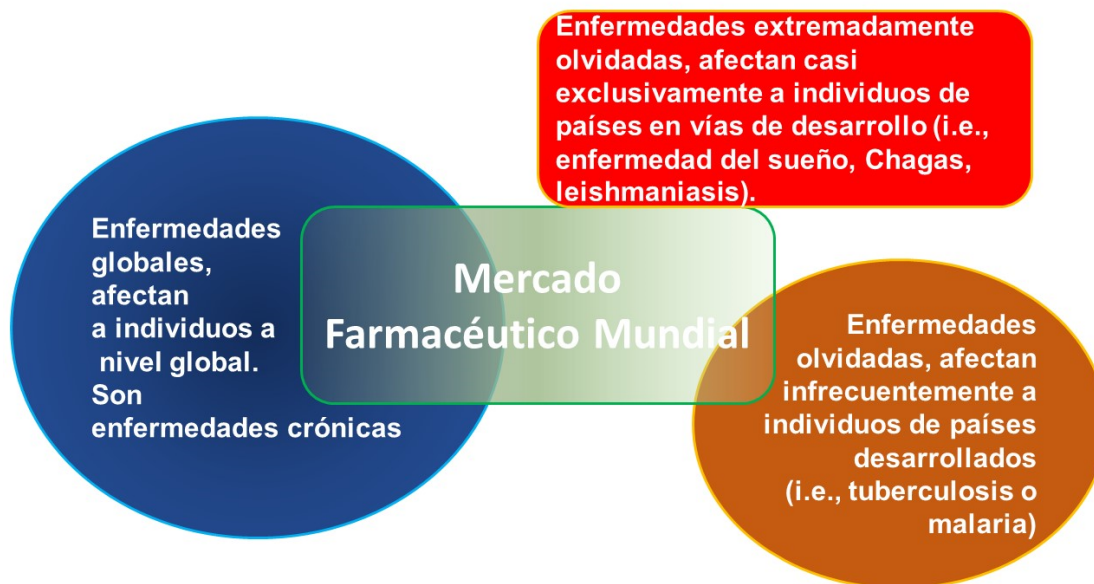
## **Enfermedades globales, desatendidas y extremadamente desatendidas**

En este contexto es entonces imprescindible catalogar las enfermedades en relación a su alcance a nivel mundial, al clasificarlas y definir las como globales, desatendidas y extremadamente desatendidas (ver figura 1).

Las primeras afectan a individuos a nivel global. Son enfermedades crónicas como la diabetes, la demencia, el cáncer. Las segundas afectan infrecuentemente a individuos de países desarrollados. Entre ellas tenemos la tuberculosis y la malaria. Las terceras afectan casi exclusivamente a habitantes de países en vías de desarrollo. Entre ellas mencionamos la enfermedad del sueño, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Hotez, 2011).

Con respecto a las enfermedades extremadamente desatendidas el panorama mundial ha sufrido un cambio radical en las últimas décadas debido esencialmente a dos fenómenos. Por una parte, el calentamiento global ha permitido que los vectores de muchas de estas enfermedades “migren” a zonas que se consideraban templadas pero que actualmente mantienen una temperatura anual que garantiza que el ciclo de vida de muchos insectos se complete, y, por lo tanto, esos lugares son “permissivos” a la entrada de parásitos que antes no podían sobrevivir en estas latitudes. Por otra parte, la migración y la movilidad entre países y continentes, cada vez más frecuente, permite que los viajeros se transformen en “transmisores silentes” de estas dolencias. Al moverse de zona geográfica llevan consigo la enfermedad que les aqueja (Gushulak y MacPherson, 2006; Hernández Pastor, 2013; Franco Giraldo y Alvarez Dardet, 2009).

¿Pero por qué se denominan desatendidas? Básicamente por su dificultad de estimular los intereses de las empresas farmacéuticas en invertir en el desarrollo de medicamentos en contra de ellas, debido a que son enfermedades que -la mayoría-, al



**Figura 1.** Inversión en investigación y desarrollo por las empresas farmacéuticas en relación a los tipos de enfermedades

no ser crónicas y poderse curar rápidamente, no representan rédito económico a largo plazo para estos consorcios (Kumar, 2020; World Health Organization, 2020).

Sin embargo, desde el punto de vista global, el impacto de las enfermedades desatendidas incide de forma radical en el desarrollo humano. ¿Por qué? Porque: reducen el potencial humano, son una enorme carga económica para los países endémicos, disminuyen el rendimiento de adultos y jóvenes en edad productiva, entorpecen el crecimiento y el desarrollo cognitivo de los niños y causan gran sufrimiento humano, estigmatización social y discriminación.

Pero desde el punto de vista conceptual tienen una gran ventaja y es que son prevenibles. Esto es maravilloso pues implica que, con medidas generalmente sencillas, que incluyen implementación de programas de salud pública y educativos, pueden paliarse los efectos de estas enfermedades. Por ello la investigación científica es fundamental para el diseño de herramientas a fin de optimizar los sistemas de salud encargados del control de estas dolencias (World Health Organization, 2020; Ponte-Sucre, 2015).

En general son enfermedades infecciosas, que proliferan en entornos calurosos y húmedos (climas tropicales). Enfermedades parasitarias, transmitidas por insectos, (mosquitos, simúlidos, flebótomos, mosca tsé-tsé, vinchuca, moscas de suciedad), o por agua contaminada y suelo infestado por huevos de gusanos. Con ciclos de transmisión que se perpetúan gracias a la contaminación ambiental y condiciones de vida e higiene deficientes. Que se concentran en entornos rurales y de pobreza extrema en el cual los niños son los más afectados. Suelen ser de evolución insidiosa. Y en algunas zonas del mundo, han desaparecido acorde con mejores niveles de vida e higiene (Ponte-Sucre, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2017; Pérez Schael, 2019).

En general, aunque pueden matar al paciente en el término de semanas o meses una vez alcanzada la fase avanzada de la enfermedad, usualmente causan trastornos graves después de varios años de una infección (asintomática), en los cuales la enfermedad se consolida y el daño se hace irreversible. Sin embargo, algo que las agrupa es que están relegadas de la discusión a nivel de la comunidad internacional, a pesar de que como se mencionó previamente, existen condiciones que obligan a que

esta situación se modifique, y cada vez a mayor velocidad.

Un elemento fundamental a considerar es que los organismos causantes de estas enfermedades son extremadamente flexibles y con mecanismos sofisticados de supervivencia, que les permiten encontrar atajos y vericuetos para subsistir en condiciones que pudieran definirse como extremadamente adversas. Debido a ello constituyen un reto constante y es necesario generar conocimiento que permita afrontar con éxito ese desafío (Ponte-Sucre, 2015).

### **Concepto de DALYS**

El que sean enfermedades insidiosas y que con frecuencia causan trastornos que sólo son evidentes varios años después de una infección (asintomática), se traduce en una pérdida real de la potencialidad de la persona, y cuando hablamos de miles o millones de personas en esta condición, podemos entonces intuir la desventaja que esa zona, región o país podría tener en cuanto a desarrollo y sustentabilidad. Este razonamiento es tan importante que se ha acuñado un término (DALYs por sus siglas en inglés), que se define como años de vida potencialmente perdidos debidos a una enfermedad crónica, que en el caso que nos ocupa se refiere a las enfermedades desatendidas (NTDs por sus siglas en inglés). Es decir, que cuando hablamos de "tiempo perdido" en relación a la productividad de, por ejemplo, un país, debemos mencionar el tiempo perdido debido a la muerte, y el tiempo "deshabilitado" por enfermedad de sus pobladores. Un DALY, por lo tanto, es igual a un año de vida saludable, perdido (Fox-Rushby y Hanson, 2001; Alvis y Valenzuela, 2010).

Este término, que contextualiza el concepto de años de vida potencialmente perdidos fue desarrollado por la Universidad de Harvard para el Banco Mundial en 1990. Su objetivo, comparar la salud de la población con la esperanza de vida en diferentes países. La Organización Mundial de la Salud lo acotó en 1996 y lo utiliza desde entonces para apoyar su lema "Invertir en Salud, Investigación

y Desarrollo". Es usado desde el 2011 en la Campaña Internacional para la Erradicación de las Enfermedades Tropicales Desatendidas y es un concepto fundamental en los estudios de Salud Pública para determinar el impacto sanitario de la salud.

### **¿Cómo ha sido el control de las enfermedades desatendidas? Rol de la investigación**

El control de las enfermedades desatendidas ha estado en general basado en programas de distribución masiva o selectiva de fármacos con acción antiparasitaria o anti infectiva. Aunque esta estrategia es importante de mantener, el resultado real de la misma ha sido sólo paliativo y en la mayoría de los casos precedero. Esto debido a que su diseño, implementación, monitoreo y evaluación, frecuencia y duración, han sido poco sistemáticos y más bien dirigidos a paliar situaciones agudas. Es por ello imprescindible delinear herramientas que permitan implementar soluciones factibles y que perduren en el tiempo (Organización Mundial de la Salud 2017, Organización Panamericana de la Salud, 2020).

Es decir, que el diseño de los instrumentos a utilizar debe fundamentarse en el meta-objetivo mencionado, "Un mundo apropiado para los niños" y debe basarse en la conformación de herramientas de diagnóstico, epidemiológicas, preventivas y terapéuticas que tengan como objetivo final optimizar los sistemas de salud encargados del control de las NTDs. Por ello es imprescindible comprender las enfermedades y conocer a fondo la fisiología de sus agentes patógenos, a fin de tener la capacidad de reaccionar a tiempo y con las estructuras adecuadas, a la emergencia de imprevistos y a la prevención adecuada de las NTDs. En pocas palabras, debemos ser capaces de producir conocimiento de calidad, útil a mediano o largo plazo para solventar estos problemas de salud que entorpecen el desarrollo de las poblaciones,

especialmente de los niños, nuestros herederos a nivel mundial.

**¿Pero, cómo comprender las enfermedades de las que hablamos?**

Tal y como se presenta en la figura 2, la comprensión cabal de cualquiera de estas enfermedades debe incluir las siguientes premisas:

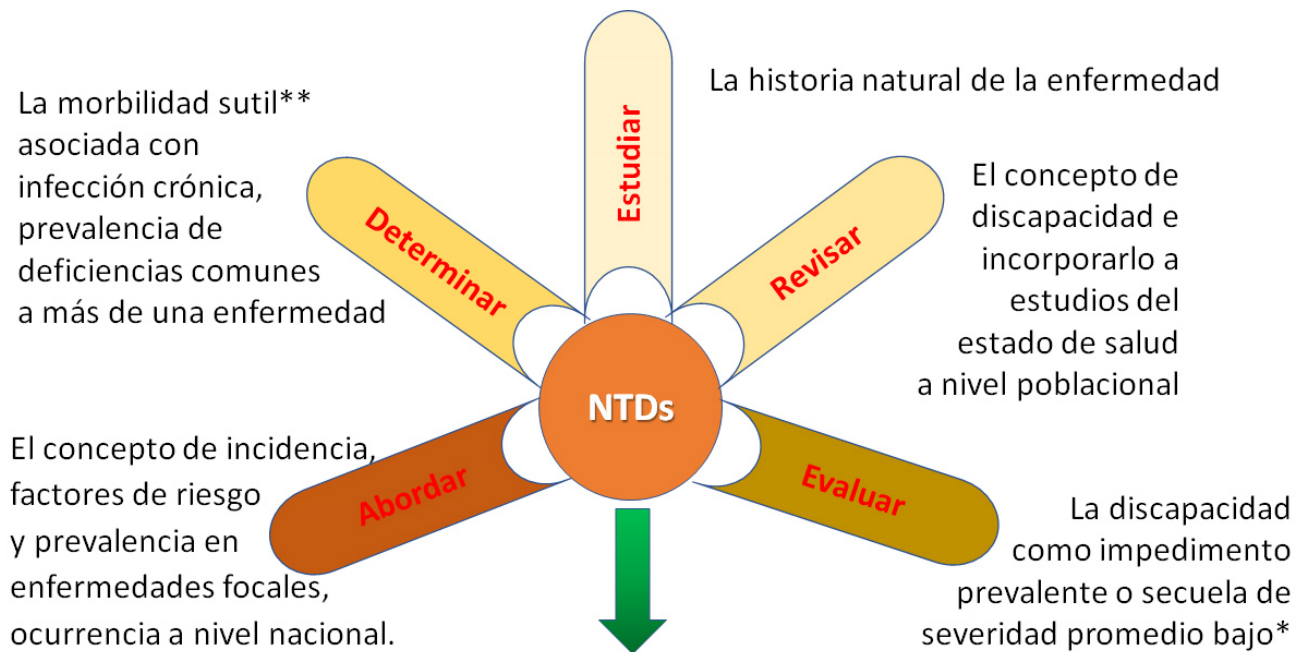
1. Estudiar La historia natural de la enfermedad a fin de discernir cómo es su evolución en el tiempo, y los condicionantes que limitan o amplían su expansión a nivel geográfico y temporal.
2. Revisar el concepto de discapacidad como uno de los procesos fisio-patológicos que de forma seria coartan el desarrollo poblacional personal y a nivel de país e incorporarlo a estudios del estado de salud a nivel poblacional.
3. Evaluar La discapacidad como impedimento prevalente o secuela de severidad promedio bajo que afecta elementos tan cotidianos pero importantes como la cognición en los niños o

la energía para trabajar en caso de anemia crónicas.

4. Determinar la morbilidad sutil, definida como pequeñas disminuciones de funcionamiento (por ejemplo, fatiga), asociada con infección crónica y su prevalencia en más de una enfermedad.
5. Abordar y cuantificar los conceptos de incidencia, factores de riesgo y prevalencia en enfermedades focales, ocurrencia a nivel nacional.

Pero esta comprensión no debe bajo ningún concepto ser estática, sino que debe mantener un enfoque cuantitativo, dinámico y flexible teniendo en cuenta los siguientes elementos:

1. La relación, parásito(s)-hospedador(es) es extremadamente flexible y unipersonal, y aunque existen delimitantes poblacionales, la excepción suele ser la regla.
2. Debido a ello, existen avances y retrocesos permanentes en la actuación del personal de salud frente a la transmisión y propagación de la enfermedad.
3. La comprensión de los numerales uno y dos



**Comprensión y control de la enfermedad y sus agentes patógenos**

\*anemia, deficiencias cognitivas

\*\*pequeñas disminuciones de funcionamiento, por ejemplo, fatiga

**Figura 2. Relación entre la investigación en salud y comprensión de las enfermedades**

significa un reto a la imaginación en la creación de conocimiento, pero principalmente en la ejecución de los programas.

4. Por último, no debemos olvidar que la información de campo y la creación del conocimiento producido por los investigadores y los ejecutores de las políticas de salud debe estar coordinado para poder actuar mancomunadamente.

### **Pero, ¿Cómo tomar el destino en nuestras manos?**

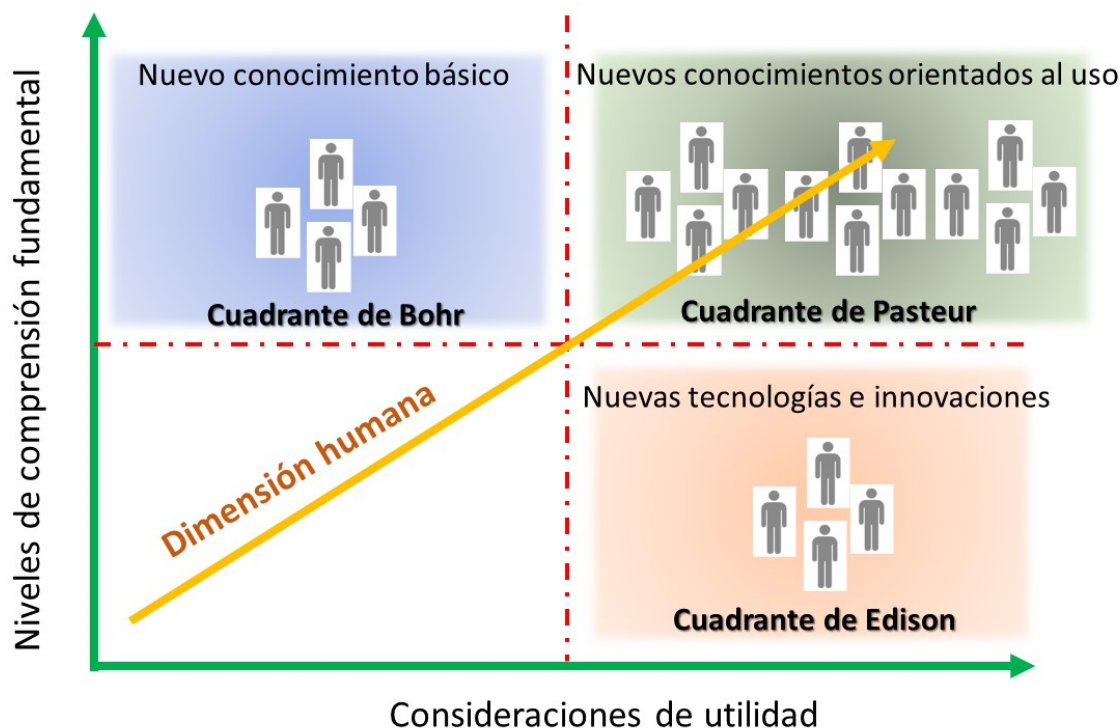
En 1945, poco antes de morir, el presidente Roosevelt solicitó a su asesor, Vannevar Bush, un informe sobre el papel de la ciencia en el desarrollo de los Estados Unidos de América una vez concluida la guerra. Truman fue quien recibió este informe y comenzó a aplicar sus recomendaciones. Fue Bush quien primero utilizó taxativamente los términos investigación básica e investigación aplicada, aunque en la obra de muchos sabios anteriores a él estos conceptos se intuyen como opuestos pero complementarios. Su claridad es tal, que, aunque es consciente de que en ocasiones el límite entre investigación básica e investigación aplicada no es muy preciso, insiste en que es la investigación básica la que marca el paso del progreso tecnológico (Bush, 1945).

Posteriormente Stokes declaró como escueto el modelo de Bush puesto que consideró que este modelo no es capaz de representar de manera fiel todos los procesos que se dan a lo largo del desarrollo de la ciencia y de la investigación, así como los dilemas y dificultades que plantea cada investigación en particular (Stokes, 1997). Stokes contrapone como elementos clave si la investigación está inspirada en la búsqueda de una comprensión básica de un fenómeno natural, o si la investigación está inspirada en consideraciones sobre la utilidad práctica de un posible desarrollo obtenido a partir de la misma, y no si la investigación es básica o aplicada. La más valiosa diferencia entre ambas visiones es que Stokes considera que toda investigación debe ser mirada desde ambas perspectivas, y que

es la motivación la que condiciona el tipo de resultados, complementando la sistematización de la ciencia con la resolución de problemas cotidianos y a veces no tan cotidianos.

Para ello diseñó el denominado Cuadrante de Pasteur (ver figura 3) en el cual, el cuadrante superior izquierdo representa la investigación básica pura (ejemplarizado en su modelo por Niels Bohr), mientras que la investigación básica orientada por sus usos (ilustrado por Luis Pasteur) se encuentra en el cuadrante derecho superior y la investigación aplicada pura (ejemplarizado por Tomas A. Edison), en el cuadrante derecho inferior. De cualquier manera, la dimensión humana escapa por completo a estos cuadrantes, no hay forma de incluirla. Es desde el cuadrante vacío -a la izquierda abajo-, desde el cual, con nuestra creatividad y políticas públicas adecuadas, podemos llenar ese vacío, especialmente cuando nuestro norte y objetivo es “lograr un mundo mejor para los niños”. Es decir, un interés científico movido por el deseo de crear un mundo mejor haciendo ciencia que no puede considerarse “pura”, ya que está honrosamente contaminada de humanismo; una ciencia del hombre para el hombre (Matijasevic, 2011). O, en otras palabras, hacer ciencia tratando de comprender fenómenos básicos de la problemática que nos rodea al tiempo que intentamos una aproximación práctica, útil, para solventar un determinado proceso o problema de salud.

En términos concretos esto quiere decir, el diseño de instrumentos estratégicos a partir del hilo conductual representado por el meta-objetivo ya mencionado, “Un mundo apropiado para los niños”. Un fin para el cual el estudio sistemático y la sociedad del conocimiento deben aunar esfuerzos a fin de apuntalar la implementación de metodologías que hagan posible la consecución de resultados concretos en temas tan diversos como la investigación básica, la provisión de servicios de salud, o la consolidación de una investigación que conecte la ciencia básica fundamental con la solución de problemas y retos de nuestra



**Figura 3.** Cuadrante de Pasteur, según Stokes incluyendo la dimensión humana como factor fundamental de la investigación en salud.

realidad continental.

En pocas palabras, para responder a estas necesidades de la sociedad debemos ubicarnos en el cuadrante de Pasteur. Y como investigadores responder, con soluciones de calidad, a estas necesidades de la sociedad.

## CONCLUSIONES

De lo discutido en este breve ensayo podemos concluir que la complejidad de la investigación en NTDs ha aumentado considerablemente y que el trabajo coordinado de grupos multidisciplinarios, que usan las tecnologías de avanzada para resolver problemas” (Big Science) pareciera ser el adecuado (Esparza y Yamada, 2007). Sin embargo, es necesario recordar que el conocimiento lo produce desde un investigador individual que trabaja sólo en su laboratorio hasta el investigador que organiza su investigación en redes.

Lo que si es cierto es que generar conocimiento es un asunto global donde el aporte de cada uno es útil y

Debido a ello la colaboración es la protagonista por excelencia del desarrollo científico y el futuro del logro de los ODM. Especialmente porque alcanzar los ODM a plenitud puede requerir hasta dos generaciones.

Debido a estas consideraciones la ONU ha propuesto la continuación de los ODM con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Estos requieren un mayor compromiso de las comunidades involucradas, incluyendo la científica, y dentro de ellas, las redes de académicos juegan un rol primordial (Esparza y Yamada, 2007; Sachs, 2012). Y los niños son y deben ser el foco de los ODS (Clarck *et al.*, 2020)

No podemos olvidar que las NTDs están postergadas en las prioridades de salud pública. Que las estadísticas asociadas a ellas son en general poco confiables. Que los países que las sufren suelen tener recursos limitados. Que son dolencias que compiten con otras más notorias. Que hay escasos incentivos para desarrollar medios de diagnóstico, medicamentos y vacunas.

Debido a ello, y para tomar el destino en nuestras

manos necesitamos afrontar los retos planteados desde la producción de conocimiento, especialmente porque el denominador común de quienes trabajamos en ciencia es preguntarnos los por qué y el cómo de lo que nos rodea. Este es un comportamiento que nos hace humanos, con el objetivo de mejorar las condiciones de vida de la sociedad en la cual vivimos. En la búsqueda de las respuestas adecuadas: creamos conocimiento, retamos nuestra curiosidad por el entorno, usamos nuestra capacidad de observación.

Como investigadores y académicos somos responsables de crear conocimiento y convencer a los ejecutores de políticas públicas de usar ese conocimiento y el proceso educativo, como herramientas esenciales para la prevención y/o control de NTDs. En nuestro contexto, América Latina, el éxito del abordaje de este tema bajo este cariz sería sinónimo de independencia y expresión de justicia. Es decir, aminorar las condiciones de inequidad existentes en países donde estas enfermedades son endémicas, siempre bajo la premisa de que como humanos (*homo sapiens*) nuestra profesión universal es ser hombres (rasgo fundamental, la sabiduría). Como adultos es nuestra responsabilidad consolidar un mundo apropiado para los niños, quienes al crecer ejercerán a su vez esa profesión universal.

## REFERENCIAS

- ALVIS N, VALENZUELA MT. (2010). "Los QALYs y DALYs como indicadores sintéticos de salud". *Revista Médica de Chile* 138:83-87.
- BUSH V. (1945). "Science: The Endless Frontier. A Report to the President by Vannevar Bush, Director of the Office of Scientific Research and Development". [Internet]. Disponible en: <http://www.nsf.gov/about/history/vbush1945.htm>
- CLARK H, COLL-SECK AM, BANERJEE A, PETERSON S, DALGLISH SL, AMERATUNGA S, et al. (2020). "A future for the world's children? A WHO-UNICEF-Lancet Commission". *The Lancet* 395:605-658.
- ESPARZA J, YAMADA T. (2007). "The discovery value of Big Science". *Journal of Experimental Medicine* 204:701-704.
- FOX-RUSHBY JA, HANSON K. (2001). "Calculating and presenting disability adjusted life years (DALYs) in cost-effectiveness analysis". *Health Policy Plan* 16:326-331.
- FRANCO-GIRALDO A, ÁLVAREZ-DARDET C. (2009). "Salud pública global: un desafío a los límites de la salud internacional a propósito de la epidemia de influenza humana". *Revista Panameña de Salud Pública* 25:540-547.
- GUSHULAK BD, MACPHERSON DW. (2006). "The basic principles of migration health: population mobility and gaps in disease prevalence". *Emerging Themes in Epidemiol.* 4:3-12.
- HERNÁNDEZ PASTOR P. (2013). "Infectious diseases, migration and global health". *Integra Educativa* VI:110-126.
- HOTEZ P. (2011). "Enlarging the "audacious goal": elimination of the world's high prevalence neglected tropical diseases". *Vaccine* 295:D104-D110.
- KUMAR A. (2020). "Picturing health: speak up, do more—the first World NTD Day". *The Lancet* 395:551-558.
- MATIJEVIC E. (2011). "El cuadrante de Pasteur". *Acta Médica Colombiana* 36:111-118.
- PÉREZ SCHAEEL I. (2019). "Argentina y Argelia: libres de malaria. También contamos su historia". [Internet]. Disponible en: <https://miradorsalud.com/argentina-y-algeria-libres-de-malaria-tambien-contamos-su-historia/>
- NACIONES UNIDAS (2000). "Declaración del Milenio". [Internet]. Disponible en: <http://www.un.org/spanish/milenio/ares552.pdf>
- NACIONES UNIDAS (2012). "Objetivos de Desarrollo del Milenio". Informe de 2012.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2017). "Proyecto de respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030". Documento de contexto para informar las deliberaciones de la Asamblea Mundial de la Salud en su 70.ª reunión.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. "Enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores". [Internet]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=37&Itemid=40760&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=37&Itemid=40760&lang=es).
- PONTE-SUCRE A. (2015). "Tejiendo la red de la ciencia para la salud en América Latina". *Cuadernos de la Escuela de Salud Pública* 3:44-54.
- SACHS JD. (2012). "From the millennium development goals to sustainable development goals". *The Lancet.* 379:2206-2211.
- SHENODA S, NATHAWAD R, SPENCER N, MERCER R, GOLDHAGEN J. (2016). "A global agenda for child health: translating the sustainable development goals and child rights into practice. International Society for Social Pediatrics and Child Health". [Internet]. Disponible en: <https://www.issop.org/2016/08/15/issop-position-statement-7sdgschildrights/>
- STOKES DE. (1997). "Pasteur's Quadrant: Basic Science and Technological Innovation". Brookings Institution Press, Washington.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). "Why are some tropical diseases called "neglected"?". [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/58/en/>

# Diversidad genómica de hongos productores de micosis profundas en Venezuela

Primavera Alvarado<sup>1</sup>

prima558@gmail.com  
http://orcid.org/0000-0002-5965-6827

Julio Vivas<sup>1</sup>

vivas.julio@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela - Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

Se actualizan los datos más relevantes en cuanto a diversidad genómica de las especies de hongos responsables de las micosis profundas sistémicas, *Paracoccidioides spp*, *Histoplasma spp*, y *Coccidioides spp*. Estos hongos comparten una característica principal, su dimorfismo. La histoplasmosis posee una distribución mundial, predominando en América y África. La paracoccidioidomicosis es exclusiva de América Latina. La coccidioidomicosis se encuentra principalmente en las regiones desérticas de Estados Unidos, México y América Central y del Sur. Recientemente, se han realizado estudios de secuenciación del genoma y análisis filogenéticos, con estos hongos patógenos utilizando cepas venezolanas y de otras regiones. A partir del 2017 se ha propuesto el siguiente reordenamiento taxonómico para *Histoplasma*: *Histoplasma ohiense sp. nov.* grupo NAm 2, *Histoplasma mississippiense sp. nov.* forma el grupo Nam1, *Histoplasma suramericanum sp. nov.* forma el grupo LAm A, *H. capsulatum sensu stricto*, *H. capsulatum var. duboisii* en África. En cuanto al género *Paracoccidioides*, se proponen cinco especies, *Paracoccidioides lutzii* (similar a Pb01), *P. brasiliensis* (S1) *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) y *P. venezuelensis* (PS4). Con relación a la coccidioidomicosis se confirmó que la especie de *C. posadasii* es endémica en Sur América y que los aislados clínicos y ambientales de Venezuela pertenecen a la especie *posadasii*. Finalmente, podemos concluir que los aislados venezolanos se llamarán ahora: *H. suramericanum*, *P. venezuelensis* y *C. posadasii*.

**Palabras Clave:** Micosis endémica; Histoplasmosis; Paracoccidioidomicosis; Coccidioidomicosis; Genómica.

## GENOMIC DIVERSITY OF FUNGI IN SYSTEMIC MYCOSES IN VENEZUELA

### ABSTRACT

This work updates the most relevant data regarding the genomic diversity of the fungal species responsible of systemic deep mycosis, *Paracoccidioides spp*, *Histoplasma spp*, and *Coccidioides spp*. These specific fungi share a main characteristic which is their thermodymorphism. Histoplasmosis has a worldwide distribution, prevailing in America and Africa. Paracoccidioidomycosis is exclusive of Latin America. Coccidioidomycosis is found mainly in the desert regions of the United States, Mexico, and Central and South America. Genome sequencing studies and phylogenetic analyzes have

been carried out with these pathogenic fungi using strains from Venezuela and other regions. As of 2017, the following taxonomic rearrangement has been proposed for *Histoplasma*: *H. ohiense* sp nov. NAm 2 group, *H. mississippiense* sp. nov. forms the Nam1 group, *H. suramericanum* sp. nov. forms the LAm A group, *H. capsulatum sensu stricto*. *H. capsulatum* var. *duboisii* in Africa. Regarding the genus *Paracoccidioides*, five species are proposed, *Paracoccidioides lutzii* (similar to Pb01), *P. brasiliensis* (S1) *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) and *P. venezuelensis* (PS4). Regarding coccidioidomycosis, it is confirmed that the *C. posadasii* species is endemic in South America and that the clinical and environmental experts from Venezuela affected the *posadasii* species. Finally, we can conclude that the Venezuelan isolated are now called: *H. suramericanum*, *P. venezuelensis* and *C. posadasii*.

**Keywords:** Endemic micosis; Histoplasmosis; Paracoccidioidomycosis; Coccidioidomycosis; Genomic.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades provocadas por hongos patógenos afectan a más de 300 millones de personas, que padecen enfermedades graves relacionadas con las micosis. Así mismo, se ha reportado que fallecen más de 1.6 millones de personas anualmente, más que la malaria y en la misma magnitud que la tuberculosis (Bongomin *et al.*, 2017). Por otro lado, son responsables de la pérdida anual de un tercio de la producción agrícola mundial (Fisher *et al.*, 2012). En estos momentos, el número de especies del reino de los hongos se puede estimar entre 2.2 a 3.8 millones, considerando que hay 120.000 especies actualmente aceptadas e identificadas hasta ahora (Hawksworth, 2001; Hawksworth *et al.*, 2016). De los 4 millones de especies, solo unos 300 son patógenos al hombre, dentro de ellos los que producen las Micosis Profundas Sistémicas (MPS), pertenecientes al orden Onygenales, familia Onygenaceae.

La diversidad geográfica y climática de América Latina proporciona una gran diversidad de ecosistemas, que permiten el desarrollo de diferentes microorganismos, incluidos los hongos patógenos. Las micosis endémicas como histoplasmosis, paracoccidioidomycosis y coccidioidomycosis, son enfermedades frecuentes en países en vías de desarrollo y en países desarrollados con áreas en las que las circunstancias ambientales facilitan el desarrollo de los hongos que las producen (Queiroz-Telles *et al.*, 2017).

El fenómeno biológico común que presentan los hongos causantes de MPS es su dimorfismo, es decir, crecen en forma saprofita en los suelos donde se encuentran en forma micelial y sus conidios son aerotransportados, logrando entrar por inhalación en los pulmones del humano, aquí el cambio de temperatura promueve su transformación a su forma levaduriforme patógena (Ashraf *et al.*, 2020).

Las MPS causadas por hongos dimorfos tienen como puerta de entrada la respiratoria. Posteriormente, la gravedad y magnitud de la infección dependerá del tamaño del inóculo y del estado inmunitario del hospedador. La mayoría de los individuos con estas infecciones permanecen asintomáticos, o con síntomas respiratorios leves, lo que puede ocurrir en individuos inmunocompetentes, pero en pacientes inmunodeficientes, la diseminación puede ocurrir involucrando varios órganos, incluido orofaringe, ganglios linfáticos, hígado, bazo, piel y glándulas suprarrenales (Carrasco-Zuber *et al.*, 2016).

La histoplasmosis posee una distribución mundial y aunque se ha encontrado en los cinco continentes, la enfermedad predomina en América y África (Wheat *et al.*, 2016). La paracoccidioidomycosis es una micosis sistémica, exclusiva de América Latina y los casos autóctonos se registran desde México hasta Argentina (Cantero, 2018). La coccidioidomycosis, presenta dos especies *C. posadasii* y *C. immitis*; la principal diferencia entre estas dos especies es su distribución geográfica. *C. immitis* se encuentra principalmente en las regiones desérticas del centro y sur de California (incluida Baja California), mientras que *C. posadasii* se encuentra en las regiones desérticas de Nevada, Arizona, Nuevo México, el oeste de Texas, México y América Central y del Sur (Kirkland *et al.*, 2018).

En Venezuela, la histoplasmosis, paracoccidioidomycosis y coccidioidomycosis, tienen carácter endémico. Las dos primeras se han reportado en casi todo el territorio nacional y la última se encuentra en las zonas semiáridas bien delimitadas en los estados Lara, Falcón y Zulia (Martínez *et al.*, 2013).

Este artículo detalla brevemente los aspectos epidemiológicos de cada micosis y los cambios taxonómicos recientes.

## La histoplasmosis

Es una micosis profunda causada por un hongo dimorfo, el *Histoplasma capsulatum*. Fue descubierta por Darling, un anatomopatólogo norteamericano en Panamá en 1905 (Rippon, 1988). Esta enfermedad afecta el sistema reticuloendotelial humano y se adquiere por inhalación de microconidios y pequeños fragmentos del micelio, que tras la llegada al alvéolo pulmonar son capturados por los macrófagos por opsonofagocitosis o por unión a sus receptores de superficie celular (López, 2006). Geográficamente, *Histoplasma* tiene el rango más amplio de distribución de todos los hongos dimórficos, aunque alguna vez se pensó que estaba confinado geográficamente a regiones de las Américas, actualmente se han notificado casos de histoplasmosis en todo el mundo. Las causas de esta distribución expandida siguen siendo inciertas, el cambio climático ha generado el calentamiento global de los ecosistemas que favorece el crecimiento de hongo y por otro lado, la pandemia del SIDA ha proporcionado hospederos humanos más susceptibles (Wheat *et al.*, 2016). La histoplasmosis se ha encontrado en los cinco continentes, menos en la Antártida, predominando en América, en particular en los Estados Unidos con áreas altamente endémicas, menor incidencia en Centroamérica, con la excepción de Panamá, y en Suramérica, en Venezuela, Brasil, Colombia y Argentina. En Asia, África, cuenca del Mediterráneo y Europa los reportes son esporádicos (Colombo *et al.*, 2011).

El *Histoplasma spp* crece de 22°C a 29°C, con precipitación aproximada de 1.200 mm, humedad relativa entre 67 a 87% y con una preferencia de suelos calizos. Además, está presente en suelos con alto contenido de nitrógeno, asociado a excrementos de pájaros y murciélagos (Bastardo de Albornoz, 1996).

En Venezuela, esta enfermedad fue identificada en 1949 y posteriormente confirmada en 1953, (Campins *et al.*, 1953). Los estados donde se ha reportado la mayoría de los casos son Zulia, Monagas, Miranda, Distrito Capital y Bolívar (Figura 1). La histoplasmosis es una de las micosis sistémicas más frecuente en pacientes con SIDA. En el estudio de 1984 a 2010, se reportaron 663 casos (Martínez *et al.*, 2013).

Posteriormente, en el trabajo del 2000 al 2005 se diagnosticaron 158 casos (Mata-Essayag *et al.*, 2008). Los diferentes estudios muestran cambios en la epidemiología que ocurre en Venezuela, tal vez debido a cambios ambientales y a la aparición y desarrollo de la pandemia del SIDA, los casos de histoplasmosis están subestimados en el país (Mata-Essayag *et al.*, 2018).

Los recientes estudios de secuenciación del genoma completo de poblaciones y los análisis filogenéticos del género *Histoplasma* promueven la existencia de cuatro especies crípticas, *H ohiense sp. nov.* (grupo NAm 2), *H mississippiense sp. nov.* (grupo Nam1) circulando en Norte América, *H. suramericanum sp. nov.* (grupo LAm A) circulando en Suramérica y en particular en Venezuela y *H capsulatum sensu stricto* distribuido en Panamá con una variedad *Histoplasma capsulatum var. duboisii* que se encuentra en África. (Sepúlveda *et al.*, 2017).

## La paracoccidioidomicosis (PCM)

Es una micosis sistémica granulomatosa causada por el complejo *Paracoccidioides brasiliensis*, exclusivo de América Latina y los casos autóctonos se registran desde México hasta Argentina. La historia de la paracoccidioidomicosis está ligada a Brasil, por ser este país la zona más endémica de esta micosis. El primer caso reportado fue en 1908 por Adolfo Lutz, quien estudió a un paciente con lesiones nasofaríngeas y adenopatías cervicales; observó al microscopio el hongo en su estado parasitario como un microorganismo multigemente, obtuvo los cultivos y comprobó el dimorfismo; no dio nombre al agente etiológico y reportó a la enfermedad como "hifoblastomicosis pseudococcidioidal". La vía de infección del *P. brasiliensis* es la respiratoria, dando un cuadro asintomático o subclínico; más tarde se puede diseminar a piel y otros órganos (Méndez *et al.*, 2017).

En general, todas las zonas endémicas de la enfermedad son subtropicales y tropicales, ubicadas entre los 500 y 1.500 m sobre el nivel del mar, con una precipitación constante que fluctúa entre los 900 y 2.000 mm por año y con temperatura entre los 17° y 24°C; son regiones de abundantes bosques con árboles nativos y atravesadas por ríos, con inviernos cortos y veranos lluviosos, la paracoccidioidomicosis está



**Figura 1.** Distribución de las micosis profundas endémicas en Venezuela.

asociada a la población rural (Cantero, 2018), representa una infección significativa en América del Sur, presente principalmente en Brasil (80%), Venezuela, Argentina y Colombia (Souza *et al.*, 2019).

En Venezuela los primeros casos de PCM fueron descritos por (O´Daly, 1937) y luego por Guerra quien destaca la importancia de la localización pulmonar de este hongo (Guerra, 1948). Posteriormente en 1971, se realizó el primer aislamiento del hongo en suelo venezolano (Albornoz, 1971).

En cuanto a los primeros estudios epidemiológicos en Venezuela sobre la frecuencia de PCM, fueron realizados desde 1985 por los Grupos de Trabajo de Micología de Venezuela, reportando que la PCM es la micosis endémica más importante en el país, encontrándose casos en casi todos los estados, aunque la mayoría de los reportes pertenecen a los estados Bolívar, Miranda, Carabobo, Monagas y Distrito Capital (Martínez *et al.*, 2013; Cermeño *et al.*, 2004) (Figura 1). En el 2013 se reportaron 674 casos, diagnosticados entre 1984 a 2010 (Martínez *et al.*, 2013). Posteriormente, en el trabajo de 1997 al 2001 del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” se

reportaron 65 casos de PCM y se resalta que, con la pandemia de SIDA, esta micosis sigue tomando gran importancia a nivel nacional (Reviakina *et al.*, 2002).

Con base a recientes estudios de análisis de genética poblacional, se considera que el agente etiológico pertenece a un complejo que incluye 5 especies crípticas: S1, PS2, PS3, PS4, and *P. lutzii*, en Venezuela circulan dos de ellas, *P. americana* (PS2) y *P. venezuelensis* (PS4) (Texeira *et al.*, 2014).

### **La coccidioidomicosis**

Es una micosis profunda causada por dos especies del hongo dimórfico *Coccidioides*, las especies *immitis* y *posadasii*; se caracteriza por una gran variedad de manifestaciones clínicas, desde coccidioidomicosis primaria pulmonar a coccidioidomicosis progresiva o diseminada, que afecta piel, tejido celular subcutáneo, ganglios linfáticos, huesos, articulaciones, vísceras y sistema nervioso central (Bonifaz, 2015; Jenks *et al.*, 2020).

*Coccidioides immitis* está restringido a la zona californiana de Estados Unidos y *Coccidioides posadasii* está presente en otras regiones de Estados

Unidos y en el resto del Continente. Son hongos de estructuras muy similares pero diferentes genéticamente. *Coccidioides* es uno de los hongos más virulentos por lo que es un agente para el desarrollo de bioterrorismo (Jenks *et al.*, 2020).

El primer caso de coccidioidomicosis fue reportado en 1892 en Argentina por Posadas, dos años más tarde, Gilchrist y Rixford comunicaron un nuevo caso en California, USA, proveniente del Valle de San Joaquín. Inicialmente, se clasificó al agente etiológico como un protozoario de la clase Sporozoa y se denominó, por su similitud con las coccidias, *Coccidioides immitis* (Deresinsk *et al.*, 2019). Posteriormente, en 1900 Ophüls estudió un tercer caso y de nuevo obtuvo los cultivos y junto con Moffit, propusieron que el agente etiológico era un hongo “dimorfo”, logrando desarrollar la enfermedad en animales, cumpliendo así los postulados de Koch. En 1905, el mismo Ophüls publicó su trabajo y describió el ciclo de vida del hongo, que es el que se conoce prácticamente hasta la actualidad (Ophüls, 1905).

Se ha comprobado que *Coccidioides sp.* puede crecer en medios pobres con variabilidad de pH, sin embargo, su mayor desarrollo se alcanza en medios ricos estériles o con poca competencia (otras especies fúngicas), quizás por el poco poder bioquímico que tiene este hongo para degradar nutrientes, lo cual explica por qué se limita a suelos pobres y con condiciones extremas. El hongo puede vivir de 5 a 30 cm debajo de la tierra y donde existe una fauna pobre, constituida predominantemente por plantas xerófitas (cactáceas), arbustos y matorrales como *Larrea tridentata* (“gobernadora”), y roedores como ratones, zarigüeyas y ardillas de tierra, que tienen el papel de vectores indirectos de la enfermedad (Bonifaz, 2015).

Estas condiciones se presentan en las zonas endémicas del Continente Americano que quedan incluidas dentro de la clasificación ecológica de zonas semidesérticas; están formadas por tierras arcillosas y arenosas, con escasa capacidad para retener el agua de las pocas precipitaciones pluviales, que fluctúan entre 150-500 mm por año, con temperatura promedio de 28°C en verano y 7°C en invierno.

En general, Latinoamérica tiene una alta proporción

de población rural dedicada al trabajo agrícola, expuestos a la inhalación o inoculación transcutánea de artroconidias de *Coccidioides*. (Laniado-Laborín *et al.*, 2019; Bonifaz, 2015).

Se han reportado casos de coccidioidomicosis en Venezuela desde 1948, principalmente en las regiones semidesérticas del noroeste del país entre 9° y 12° de latitud norte (Campins, 1970). La zona endémica árida y semiárida está restringida a los estados Zulia, Lara y Falcón (Figura 1), que se caracterizan por climas cálidos, áridos y secos, baja altitud, vegetación xerofítica, suelos arenosos con altas concentraciones de sal (boro y sulfato de calcio) y pH alcalino, que presumiblemente es favorable para el desarrollo de *Coccidioides* (Martínez *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2010). Su mayor frecuencia de reproducción se lleva a cabo en los meses cálidos y de mayor precipitación pluvial; no obstante, es en la época de sequía cuando la enfermedad se puede adquirir con más facilidad, debido a que se originan fuertes polvaredas que remueven el hongo y transportan las esporas.

En 2002, se diferenciaron dos especies mediante técnicas de biología molecular (secuencias de nucleótidos), dejando a *C. immitis* para la zona de California, EU, y *C. posadasii*, para otros estados de Norteamérica y la mayoría de los aislamientos del resto del continente (Fisher *et al.*, 2002).

## Estudios filogenéticos

La identificación de especies crípticas y la delimitación de las especies en hongos, ha impulsado la investigación para identificar diferencias en morfología, estrategias de virulencia, susceptibilidad a medicamentos y su historia natural. Dilucidar los límites de especies sería beneficioso no solo para comprender la sistemática y evolución de los hongos patógenos, sino también para observar si las diferencias en las manifestaciones clínicas de las micosis, en diferentes regiones geográficas, se atribuyen a la existencia de diferentes especies crípticas dentro del género (Taylor *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2000).

Por otro lado, la evolución biológica, ha originado la diversidad que presentan los hongos a partir de un ancestro común. Por lo que los estudios filogenéticos,

son esenciales porque permiten identificar mutaciones y distintos linajes que logran evidenciar las variaciones de las cepas por regiones. Es por ello, que identificar la cepa específica, ubicación geográfica y su mutación ayudaría a comprender su desarrollo y ampliar las herramientas de diagnóstico en cuanto a la diversidad genética demográfica (Taylor *et al.*, 2000).

Con el fin de establecer la biodiversidad genómica de los hongos productores de micosis profundas en estos géneros, se han realizado diferentes trabajos. En el 2017, se efectuó la secuenciación del genoma y análisis filogenéticos del género *Histoplasma* (Sepúlveda *et al.*, 2017). En ese trabajo utilizaron 21 aislados de USA, 7 de América Latina y 2 de África. La exploración sistemática de diferencias fenotípicas reveló que el género *Histoplasma* engloba una gran diferenciación en términos de virulencia, morfología y estrategias patogénicas. Además, demostraron que las diferencias fenotípicas coinciden con la diferenciación genética y filogenética y son probablemente el resultado de eventos previos de especiación no identificados dentro de *Histoplasma* (Sepúlveda *et al.*, 2017).

En base a sus resultados y con un alto nivel de concordancia genómica propusieron un reordenamiento taxonómico del género de *Histoplasma* de la siguiente manera:

- *Histoplasma ohiense* sp. nov. forma el grupo NAM 2. *Ohiense* están distribuidos en Norte América, con una alta prevalencia en el Valle Ohio.
- *Histoplasma mississippiense* sp. nov. forma el grupo Nam1. *Mississippiense* están distribuidos en Norte América con una alta densidad en el Valle del Mississippi.
- *Histoplasma suramericanum* sp. nov. forma el grupo LAm A. *suramericanum* distribuidos en Suramérica y es la especie que se encuentra en Venezuela.
- *Histoplasma capsulatum sensu stricto* presente en Panamá.
- *Histoplasma capsulatum var. duboisii* que se encuentra en África.

Por otra parte, el hongo patógeno *Paracoccidioides spp* inicialmente constituido por cinco especies filogenéticas, de las cuales cuatro formaban el complejo de especie *brasiliensis*. La genealogía de

genes nucleares apoyaba este escenario divergente, pero los loci mitocondriales no; es decir, que mientras todas las especies pertenecientes al complejo *brasiliensis* están diferenciadas en la codificación del loci nuclear, esto no ocurría con el loci mitocondrial. En el 2017, se abordó la búsqueda de la fuente de esta incongruencia, utilizaron 11 fragmentos de genes previamente publicados, 10 nuevas secuencias de regiones no codificantes nucleares y 10 micro satélites (Turissini *et al.*, 2017). Finalmente, pudieron demostrar que esta incongruencia mitocondria/núcleo en el complejo de especies *brasiliensis* surgió de una hibridación interespecífica y la introgresión mitocondrial, fenómenos comunes en eucariotas. Por último, Turissini *et al.*, 2017 propusieron elevar 4 de estas especies filogenéticas de *Paracoccidioides* al criterio formal de especies de esta manera: *Paracoccidioides lutzii* (similar a Pb01), *P. brasiliensis* (S1) *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) y *P. venezuelensis* (PS4).

Por otra parte, en el 2016 se identificó una división del linaje S1 en dos clados que denominaron S1a y S1b (Muñoz *et al.*, 2016). Además, encontraron evidencias de un mayor intercambio genético entre el linaje S1b y todos los demás linajes, lo que puede explicar el amplio rango de dispersión geográfica que muestra S1b (Muñoz *et al.*, 2016). También, hallaron evidencia de selección positiva para los genes del antígeno GP43 y PGA1 y genes que codifican otras proteínas, proteasas secretadas y mutaciones en los genes de proteasas y de pared celular; en conjunto todos estos eventos pueden contribuir a la virulencia y a la variación de la respuesta inmune del hospedero entre los aislamientos naturales de *Paracoccidioides spp*.

En particular, las especies de *Paracoccidioides* muestran superposición de área geográfica. Por lo que se piensa que Brasil y Venezuela albergan más de una especie de *Paracoccidioides*, abriendo la posibilidad de intercambio de genes entre las especies *P. americana* y *P. venezuelensis* coexistentes en Venezuela (Teixeira *et al.*, 2014); y *P. americana*, *P. brasilienses sensu stricto* y *P. lutzii* coexistentes en Brasil (Muñoz *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2014).

Teixeira *et al.* (2020), publicó un trabajo donde se

incluyó 31 aislamientos de *Paracoccidioides* provenientes de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Venezuela, los cuales fueron secuenciados nuevamente. Los genomas de estos aislamientos se compararon con los genomas disponibles públicamente; en primer lugar se reafirmó que los aislados venezolanos son *P. venezuelensis* y pueden coexistir junto con *P. americana*.

Por otro lado, *P. restrepiensis* coexiste con *P. brasiliensis sensu stricto* en las mismas localidades y otras especies de *Paracoccidioides* también muestran superposición de rango geográfico: *P. brasiliensis* coexiste con *P. lutzii* y *P. americana*.

Con relación a la PCM en Argentina y Paraguay, estudios previos de cuatro cepas provenientes de estos países, habían sido genotipadas usando diez loci nucleares secuenciados. Estos cuatro aislamientos habían sido denominados *P. brasiliensis sensu stricto* (Matute *et al.*, 2006; Turissini *et al.*, 2017). Posteriormente, en el estudio del 2020, se demuestra que PCM en Argentina y Paraguay es causada por tres genotipos de *Paracoccidioides*, *P. brasiliensis* (S1a y S1b) y *P. restrepiensis* (PS3) (Teixeira *et al.*, 2020). Además, se encontró que los aislados de *P. brasiliensis* S1a de Argentina se asocian frecuentemente con formas crónicas de la enfermedad. Estos resultados proponen, que los aislamientos secuenciados para comprender la diversidad genética de *Paracoccidioides* en Suramérica, sugieren que en estas regiones residen múltiples especies de *Paracoccidioides*, revelando la importancia del muestreo sistemático en la definición del área geográfica de cada uno de estos patógenos (Teixeira *et al.*, 2020).

Con relación a la coccidioidomicosis, se caracterizaron muestras de *Coccidioides spp.*, de suelos venezolanos y se plantearon la detección molecular de *Coccidioides spp.* en áreas endémicas de Venezuela y compararon las secuencias obtenidas con los perfiles genéticos de *Coccidioides* de secuencias clínicas disponibles en el GenBank (Alvarado *et al.*, 2018). Las muestras de suelo fueron recolectadas de los municipios Urumaco, Sucre y Democracia en el estado Falcón y en los municipios Urdaneta y Torres localizados en el estado Lara. De cada sitio se estudió: tipo de suelo, composición físico-química, tipo de

suelo, composición físico-química, tipo de vegetación, coordenada geográfica, medición de temperatura y precipitación. Posteriormente, se efectuó la extracción de ADN de los suelos y se realizó la detección molecular de *Coccidioides spp* por PCR en tiempo real, amplificación de ITS2, secuenciación y análisis filogenético (Alvarado *et al.*, 2018).

En este trabajo se encontró, que la especie de *C. posadasii* es endémica en los municipios de zonas áridas y semiáridas de Venezuela, ya que pudieron detectar ADN específico de *Coccidioides posadasii* en todas las áreas muestreadas. Se encontró alta concentración de ADN de *Coccidioides* en los municipios, Urumaco, Sucre, Democracia (estado Falcón), moderada concentración de ADN en los municipios, Urdaneta y Torres (estado Lara) y baja concentración de ADN en los municipios Urdaneta y Torres.

Teixeira *et al.* (2019), estudiaron aislados clínicos venezolanos, secuenciaron 10 aislamientos de *Coccidioides spp.*, y establecieron su relación con 72 aislamientos secuenciados previamente por otros autores. En primer lugar se encontró, que todos los aislados pertenecen a la especie *C. posadasii*; además, siete de los aislados venezolanos forman un grupo monofilético con poca diversidad, que se diferencia de otras poblaciones de *C. posadasii*. Así mismo, se encontró que las poblaciones centroamericanas de *C. posadasii* son el resultado de una mezcla entre América del Norte y Venezuela. Estos hallazgos revelan la importancia de caracterizar las poblaciones tropicales de *Coccidioides* y cómo residen distintas variantes genéticas en ellas, así como las probables diferencias fenotípicas entre las poblaciones que permiten contribuir al conocimiento de la evolución de otras poblaciones en regiones subtropicales y templadas.

Finalmente, podemos concluir de los estudios genómicos que se han realizado, que los aislados de hongos productores de micosis sistémicas en Venezuela se denominan: *Histoplasma suramericanum*, *Paracoccidioides venezuelensis* y *Coccidioides posadasii*.

## REFERENCIAS

- ALBORNOZ DE MB. (1971). "Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela". *Sabouraudia* 9:248-253.

- ALVARADO P, TEIXEIRA MM, ANDREWS L, FERNÁNDEZ A, SANTANDER G. (2018). "Detection of *Coccidioides posadasii* from xerophytic environments in Venezuela reveals risk of naturally acquired coccidioidomycosis infections". *Emerg Microbes Infect.* 7(1):46.
- ASHRAF N, KUBAT RC, POPLIN V, ADENIS AA, DENNING DW. (2020). "Re-drawing the maps for endemic mycoses". *Mycopathologia* 10.
- BASTARDO DE ALBORNOZ MC. (1996). "Tema de Micología Médica. Capítulo 13. En: Histoplasmosis. ElAlca. Caracas, Venezuela". p. 201-220.
- BONGOMIN F, GAGO S, OLADELE R, DENNING D. (2017). "Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision". *J Fungi (Basel)* 3(4):57.
- BONIFAZ A. (2015). "Micología Médica Básica". Capítulo 19. En: *Coccidioidomycosis. 5a Edición. Editorial Mc Graw-Hill, Mexico.* p. 261-278.
- CAMPINS H. (1970). "Coccidioidomycosis in South America. A review of its epidemiology and geographic distribution". *Mycopathol Mycol Appl* 41(1):25-34.
- CAMPINS H, SCHARYJ M. (1953). "Comprobación de la histoplasmosis en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas.* 61(1):67-75.
- CANTEROS CE. (2018). "Paracoccidioidomycosis: chronicle of a neglected disease". *Medicina (B Aires)* 78(3):180-184.
- CARRASCO-ZUBER JE, NAVARRETE C, BONIFAZ A, FICH F, VIAL-LETELIER V. (2016). "Cutaneous involvement in the deep mycoses: A review. Part II -Systemic mycoses". *Actas Dermosifiliogr* 107(10):816-822.
- CERMEÑO JR, HERNÁNDEZ I, CERMEÑO JJ, GODOY G, CERMEÑO JJ. (2004). "Epidemiological survey of histoplasmine and paracoccidioidine skin reactivity in an agricultural area in Bolívar state, Venezuela". *Eur J Epidemiol* 19:189-193.
- COLOMBO AL, TOBÓN A, RESTREPO A, QUEIROZ-TELLES F, NUCCI M. (2011). "Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America". *Med Mycol* 49(8):785-98.
- DERESINSKI S, MIRELS LF. (2019). "Coccidioidomycosis: What a long strange trip it's been". *Med Mycol* 57(1):S3-S15.
- FISHER MC, HENK DA, BRIGGS CJ, BROWNSTEIN JS, MADOFF LC. (2012). "Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health". *Nature* 484:186-194.
- FISHER MC, KOENING GL, WHITE TJ, TAYLOR JW. (2002). "Molecular and genealogies description of *Coccidioides posadasii* sp. Nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*". *Mycologia* 94:73-84.
- GUERRA D. (1948). "El granuloma a *Paracoccidioides*. Su importancia en patología pulmonar". *Rev San Asist Soc Venezuela* 4:921-927.
- HAWKSWORTH DL. (2001). "The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited". *Mycol Res* 105:1422-1432.
- HAWKSWORTH DL, LUCKING R. (2016). "Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species". *The Fungal Kingdom* 5(4):79-95.
- JENKS JD, REED SL, HOENIGL M. (2020). "Risk factors and outcomes of culture-proven acute *Coccidioides* spp. infection in San Diego, California, United States". *Mycoses* 63(6):553-557
- KIRKLAND TN, FIERER J. (2018). "*Coccidioides immitis* and *posadasii*; A review of their biology, genomics, pathogenesis, and host immunity". *Virulence* 9(1):1426-1435.
- LANIADO-LABORÍN R, ARATHOON EG, CANTEROS C, MUÑIZ-SALAZAR R, RENDON A. (2019). "Coccidioidomycosis in Latin America". *Med Mycol* 57(1):S46-S55.
- LÓPEZ CE. (2006). "Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*". *Rev Argent Microbiol* 38(4):235-42.
- MARTÍNEZ MÉNDEZ D, HERNÁNDEZ VALLES R, ALVARADO P, MENDOZA M. (2013). "Mycosis in Venezuela: Working Groups in Mycology reported cases (1984-2010)". *Rev Iberoam Micol* 30(1):39-46.
- MARTÍNEZ-MÉNDEZ D, SEMPRÚN HERNÁNDEZ N, HERNÁNDEZ-VALLES RC. (2015). "Coccidioidomycosis: current status of the endemic in Venezuela". *Invest Clin* 56:411-420.
- MARTÍNEZ D, VALLES RH. (2010). "Ecología de la coccidioidomycosis en el municipio Falcón de la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela". *Rev Soc Ven Microbiol* 30:97-101.
- MATA-ESSAYAG S, COLELLA MT, ROSELLO A, HARTUNG C, LANDAETA ME. (2008). "Histoplasmosis. A study of 158 cases in Venezuela, 200-2005". *Medicine* 87(4):193-202.
- MATA-ESSAYAG S, LANDAETA ME, MERINO R, GARRIDO L, MOTA D. (2018). "Histoplasmosis en Venezuela: un enemigo no sospechado". *Tribuna del Investigador* 19(1).
- MATUTE D, MCEWEN J, PUCCIA R, MONTES B, SAN-BLAS G. (2006). "Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies". *Mol Biol Evol* 23(1):65-73.
- MENDES RP, CAVALCANTE RS, MARQUES SA, MARQUES MEA, VENTURINI J. (2017). "Paracoccidioidomycosis: Current perspectives from Brazil". *Open Microbiol J* 11:224-282.
- MUÑOZ JF, FARRER RA, DESJARDINS CA, GALLO JE, SYKES S. (2016). "Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*". *mSphere* 28:e00213-16.
- O'DALY JA. (1937). "Las Blastomycosis en Venezuela. (Primera comunicación)". *Boletín Hospital Vargas Distrito Federal (Vzla)* 36:127-156.
- OPHÜLS W. (1905). "Further observations on a pathogenic mould formerly described as a protozoon (*Coccidioides immitis*, *Coccidioides pyogenes*". *J Exp Med* 1:443-485.
- QUEIROZ-TELLES F, FAHAL AH, FALCI DR, CACERES DH, CHILLER T. (2017). "Neglected endemic mycoses". *Lancet Infect Dis* 17(11):e367-e377.
- REVIÁKINA V, PANIZO M, DOLANDE M, MALDONADO B. (2002). "Micosis profundas sistémicas: Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante 5 años (1997-2001)". *Rev Soc Ven Microbiol* 22(2):164-168.

- RIPPON JW. (1988). "Medical Mycology". Cap. 15. 3era edición. Editorial WB Saunders Company. p. 381-423.
- SEPÚLVEDA VE, MÁRQUEZ R, TURISSINI DA, GOLDMAN WE, MATUTE DR. (2017). "Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*". *mBio* 8(6):e01339-17.
- SOUZA RL, BONAN PR, PINTO MB, PRADO JD, DE CASTRO JF, et al. (2019). "Oral paracoccidioidomycosis in a non-endemic region from Brazil: A short case series". *J Clin Exp Dent* 11(10):e865-e870.
- TAYLOR JW, TURNER E, TOWNSEND JP, DETTMAN JR, JACOBSON D. (2006). "Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1947-1963.
- TAYLOR JW, JACOBSON DJ, KROKEN S, KASUGA T, GEISER DM. (2000). "Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi". *Fungal Genet Biol* 31:21-32.
- TEIXEIRA MM, THEODORO RC, NINO-VEGA G, BAGAGLI E, FELIPE MS. (2014). "Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence". *PLoS Pathog* 10(10):e1004397.
- TEIXEIRA M, CATTANA M, MATUTE D, MUÑOZ J, ARECHAVALA A. (2020). "Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent". *Fungal Genet Biol* 140:103395.
- TEIXEIRA MM, ALVARADO P, ROE CC, THOMPSON GR 3rd, PATANÉ JSL. (2019). "Population structure and genetic diversity among isolates of *Coccidioides posadasii* in Venezuela and surrounding regions". *mBio* 01976-19.
- TURISSINI DA, GOMEZ OM, TEIXEIRA MM, MCEWEN JG, MATUTE DR. (2017). "Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*". *Fungal Genet Biol* 106:9-25.
- WHEAT LJ, AZAR MM, BAHR NC, SPEC A, RELICH RF. (2016). "Histoplasmosis". *Infect Dis Clin North Am* 30(1):207-27.

# Lepra en Venezuela: Puesta al día

**Lucibel Crespo<sup>1</sup>**

lucibelcrespo@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1808-6669>

**Elsa Rada<sup>1</sup>**

elsa.rada@gmail.com

**Jose Guevara<sup>2</sup>**

drmonra@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

La Lepra es una enfermedad infecciosa milenaria en donde existen avances importantes en el conocimiento del agente causal y en la elaboración de nuevos métodos diagnósticos para la enfermedad. Se realiza una revisión de los principales aspectos epidemiológicos, diagnósticos, de tratamientos utilizados y del papel del Instituto de Biomedicina en el manejo de la lepra en Venezuela.

**Palabras Clave:** lepra; Venezuela; diagnóstico; tratamiento; epidemiología.

## LEPROSY IN VENEZUELA: UPDATE

### ABSTRACT

Leprosy is an ancient infectious disease where there are important advances in the knowledge of the causal agent and in the development of new diagnostic methods for the disease. A review of the main epidemiological, diagnostic and treatment aspects and the role of the Institute of Biomedicine in the management of leprosy in Venezuela is carried out.

**Keywords:** leprosy; Venezuela; diagnosis; treatment; epidemiology

## INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infectocontagiosa crónica producida por el *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis*. Estas bacterias son intracelulares, ácido/alcohol resistentes con especial afinidad por las células de Schwann y el sistema retículoendotelial, y comprometen básicamente la piel, mucosas y nervios periféricos, pero pueden atacar otros órganos (Reyes, 2013). Es una patología infecciosa milenaria con evidencia arqueológica que ubica a la bacteria en seres humanos desde el Segundo Milenio antes de Cristo (Haas *et al.*, 2000, Robbins *et al.*, 2009), es por ello que es mencionada en textos como la Biblia, en el Atharva-Veda (libro sagrado de la India), entre otros. A pesar de su antigüedad, actualmente pertenece a las enfermedades olvidadas o desatendidas que tienen relevancia en la Salud Pública, en donde se invierten escasos recursos para el tratamiento. La Organización mundial de la salud (OMS o WHO) promueve fomentar su estudio para lograr la eliminación de la enfermedad, así como su estigma al comprometer no solo la salud sino la calidad de vida de los pacientes y sus familiares (Ovalles *et al.*, 2010).

El origen de la lepra en América viene con la llegada de los conquistadores y el tráfico de esclavos desde África. El primer caso en Venezuela se ubica en el año 1626, en la persona de Don Pedro Gutiérrez de Lugo, Capitán General de la Provincia y posteriormente la enfermedad se fue diseminando. Esto motivó a la creación de Lazaretos o Leprocomios, centros en donde habitaban los pacientes con la enfermedad. Los principales se ubicaban en Cumaná (1750), Isla de la Providencia (1831) Ciudad Bolívar Angostura (1839), Barcelona (1846), Táchira (1874), y Cabo Blanco (litoral central 1906) (Zulueta, 1994). Dichos centros disponían de instalaciones hospitalarias y comunales (iglesia, cine, cárcel) y se puso a circular una moneda especial, el lazareto, todo de manera de que los enfermos estuvieran aislados.

Con el descubrimiento del bacilo productor de la enfermedad por Gerhard Henrik Armauer Hansen en

el año 1873 comenzó la etapa científica de la lepra (Hansen, 1874). Este momento crucial cambió el enfoque de la patología pasando a ser una enfermedad infecciosa con posibilidad de tratamiento y erradicación. Es por ello que hoy la conocemos como enfermedad de Hansen.

La terapéutica de la lepra en el mundo ha pasado por varias fases que inician con la etapa de la incurabilidad, en donde se utilizaban diversos compuestos como grasa de pantera, aceite de Chaulmoogra, sales amoniacaes, tintura de alcibar o mirra para las úlceras, termocauterío, radioterapia, sales de oro, entre otros, para el tratamiento de los síntomas. En 1941, tras el descubrimiento de las sulfonas, se inició la monoterapia para el tratamiento de la enfermedad. A partir de dicha fecha se emplearon diversos medicamentos como la dapsona (DDS), rifampicina y clofazimina (Soucre *et al.*, 2018). En el año 1946 se creó la división Venezolana de Lepra y se inició el tratamiento ambulatorio con DDS, permitiéndose la incorporación de los pacientes a la sociedad, con la posterior eliminación de los leprocomios. Comenzó la búsqueda activa de casos y el control de los contactos incrementándose la detección y prevalencia de la enfermedad. A partir del año 1956 comenzó el descenso gradual de los casos en Venezuela hasta alcanzar cifras estables (Zulueta, 1994). En 1972 se creó el Instituto de Dermatología hoy llamado Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit" en honor al Dr Convit, médico pionero en el estudio, tratamiento y control de la lepra. Dicha institución desde ese momento cumple funciones normativas, metodológicas, de investigación y docencia que se enfocan en el área dermatológica y en el desarrollo de programas sanitarios, en donde la lepra ocupa un lugar fundamental, bajo la supervisión del MPPS, de la Organización Panamericana para la salud (OPS) y de la OMS. Durante todo este proceso, la Universidad Central de Venezuela (UCV) ha jugado un papel fundamental, trabajando de manera coordinada en el área de investigación y docencia.

A partir del año 1981, debido a los problemas de resistencia a la monoterapia, la OMS inició el programa de terapia multidroga supervisada (rifampicina, DDS y clofazimina) que es el que se

utiliza actualmente (WHO, 2018). La Institución trabaja en conjunto con los Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales disponibles en casi todo el territorio nacional para garantizar el tratamiento a los pacientes. Durante todos estos años de historia se han ajustado los mecanismos para el control de la enfermedad. Actualmente la visión del programa a nivel mundial va dirigida a definir estrategias geográficas por grupos de trabajo, elaborar literatura de referencia, conocer la distribución de la enfermedad, caracterizar genómicamente al agente causal, poblaciones susceptibles, realizar el seguimiento de los casos y su tratamiento, además de elaborar nuevas técnicas de diagnóstico, puntos a los cuales nos referiremos a continuación.

En el Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit se realiza diariamente el descarte y tratamiento de casos, evaluación de contactos, se reportan los datos al MPPS y OMS y se imparte docencia al área de pregrado de la UCV y postgrado de Dermatología, Estomatología, Medicina interna del Hospital Vargas y la UCV, entre otros. Además es un centro de Formación para personal sanitario en lepra, que ha aportado a lo largo del tiempo datos importantes en el diagnóstico, tratamiento, conocimiento de aspectos epidemiológicos y fundamentos de la inmunoterapia (Convit *et al.*, 1983), que a pesar de que no se utiliza actualmente ha permitido avances en la investigación de la enfermedad.

### **Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Hansen**

Tras el inicio de la poliquimioterapia (PQT), se ha evidenciado un descenso de la prevalencia mundial de la enfermedad. En 1997 Venezuela alcanzó los niveles de eliminación de la lepra a nivel nacional (< 1 caso por 10.000 habitantes (hab) (Convit *et al.*, 1999). A nivel mundial para el año 2018 se reportaron 184.238 casos, con una prevalencia de 0,24 x 10.000 hab. En América se reportaron 30.957 casos nuevos, encontrándose la mayor incidencia en Brasil (93%) (WHO, 2019). A pesar de ello no se considera, a excepción de Brasil, un problema nacional de Salud Pública y pertenece a las enfermedades desatendidas.

Si evaluamos los datos a nivel subregional, la realidad es otra. Permanecen poblaciones hiperendémicas en zonas como los llanos, la Guaira y Miranda, por lo que actualmente se puede hablar de eliminación más no de erradicación de la enfermedad. La OMS busca disminuir los casos a < 1 caso por 10.000 hab a nivel subregional. Se establece como meta disminuir la discapacidad. Grado II (articulaciones rígidas, resorción ósea, pseudo amputaciones, deformidad visible, ceguera entre otros signos clínicos) en nuevos casos a menos de 1 por millón de hab, sin discapacidad en niños menores de 15 años con nuevo diagnóstico y sin discriminación para pacientes con Hansen. Dichas metas se resumen en la estrategia global para la lepra 2016-2020 (WHO, 2016).

Actualmente las tasas de detección de lepra se encuentran en descenso en Venezuela. Para el año 2018 se ubicaban a nivel nacional en 0,08 x 10.000 hab., siendo los estados más representativos Apure (0,45 x 10.000 hab) Portuguesa (0,39 x 10.000 hab) y Cojedes (0,36 x 10.000 hab) (Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina (SAIB, 2018). Una de las posibles explicaciones a este hecho son la dificultad de acceso a los centros de atención por motivos económicos y de transporte, la disminución en la capacidad de penetración del personal de salud en las zonas de riesgo lo cual lleva a un subregistro y la migración, que es un fenómeno reciente detectado en la población con Hansen (Contreras *et al.*, 2011). Para el año 2018 el 9% de los nuevos casos diagnosticados en el Instituto de Biomedicina solicitaron traslado a otros países para el seguimiento de su enfermedad. Venezuela representa el quinto país con más reportes de nuevos casos de lepra en América con 245 para el año 2018, luego de Brasil (28.660), Paraguay (345), Colombia (324) y Argentina (269). A pesar de ello somos el segundo país en prevalencia de casos en la región (con 790 casos) (WHO, 2019). Esto se debe a los índices de deserción y reinserción de los pacientes en el programa de lepra, lo cual hace que cumplan el tratamiento fuera del periodo recomendado por la OMS (18 meses) o requieran nuevos ciclos. Se realizan esfuerzos en la reinserción de dichos pacientes al tratamiento, para lograr la curación de la enfermedad. Es por ello que se propone una estrategia de control de

poblaciones basada en la realización de censos, con convocatoria directa y examen clínico casa por casa con la colaboración de la población, así como la realización de campañas informativas de autoexamen de piel para detectar casos sospechosos y sensibilizar a la población con Hansen a que mantengan el tratamiento. Otra medida que se ha implementado en el Instituto de Biomedicina es la aplicación de los Sistemas de Información Geográficos, con herramientas online que nos permiten ubicar de manera espacial los nuevos casos para así implementar medidas de control en zonas particulares de mayor riesgo a nivel regional.

La forma clínica predominante en Venezuela para el año 2018 es la multibacilar (MB) (85,7%), y afecta en un 68% al sexo masculino, con un 3,2% de lepra infantil (menores de 15 años) y un 5,7% de discapacidad Grado II a nivel nacional (SAIB, 2018). Estos valores se corresponden a la literatura mundial, en donde predominan los casos MB, con menor afectación en mujeres (por factores desconocidos en donde se implican aspectos hormonales) y con menos casos en niños y ancianos. La presencia de casos en niños refleja la persistencia del bacilo en las comunidades, la transmisión activa y la exposición temprana al bacilo (Contreras *et al.*, 2014) y el alto nivel de discapacidad puede ser explicado por un diagnóstico tardío. La lepra infantil presenta una epidemiología bimodal, con escasa presencia de fenómenos reaccionales. Existe un predominio de casos paucibacilares (PB) en menores de 10 años con predominio de los fenómenos reaccionales (FR) tipo I y con un comportamiento similar al adulto, en mayores de dicha edad prevaleciendo los FR tipo II (Cortés *et al.*, 2004; Di Martino *et al.*, 2011). Así mismo podemos evidenciar casos de neuritis subdiagnosticados lo cual lleva a discapacidad en dicho grupo etario, por lo que debemos enfocarnos en el descarte en contactos infantiles para lograr la meta de la OMS. En el Instituto de Biomedicina se reportaron un 33% de FR en niños, fenómeno que puede ser explicado por ser un centro de referencia de la enfermedad (SAIB, 2018).

Las tasas de curación promedio a nivel mundial se ubican por encima del 90%. En Venezuela para el año 2017 se encontraban en 66% en MB y 94% en PB

(SAIB, 2018). Estos valores se deben a la optimización de registros de deserción de los pacientes del programa.

En las poblaciones hiperendémicas existe enfermedad subclínica y subregistro. Esto aunado a los largos periodos de incubación de la enfermedad, a los factores de riesgo y transmisión aún inciertos, a la potencial discapacidad que origina y a la inexistencia de una vacuna eficaz, mantiene el interés de la población médica en esta enfermedad. En estudios realizados por el Instituto de Biomedicina (IB) en poblaciones hiperendémicas se ha evidenciado un alto número de pacientes PB y lepra infantil (Aranzazu *et al.*, 2012). En esas zonas, existe menor densidad de personal de salud calificado para el manejo de la enfermedad y existen niveles altos de inseguridad que dificultan el descarte activo de casos (Guevara *et al.*, 2017).

Existe mayor prevalencia de casos en climas tropicales y subtropicales, con elevada temperatura y precipitaciones, con zonas deforestadas y de difícil acceso (Silva *et al.*, 2010). La sobrevivencia del bacilo en el medio ambiente tropical, se estima en 36 horas o más (hasta 9 días). Además existen intermediarios en la transmisión, como son las amibas de vida libre, que permiten mayor supervivencia del bacilo en el ambiente (Lahiri *et al.*, 2008). Han sido asociados como factores de riesgo de la enfermedad; la falta de agua, el baño en aguas estancadas, ríos, lagos o lagunas, la baja frecuencia de cambio de ropa de cama o hamaca (>bisemanal), las viviendas tipo rancho o casas rurales con ambientes oscuros y la mala disposición de excretas (aire libre, pozo séptico (Hegazy *et al.*, 2002; Kerr-Pontes *et al.*, 2006).

El principal reservorio del bacilo de Hansen es el ser humano. A pesar de ello se han involucrado otros animales tales como algunas especies de primates (Chimpancés, Monos Mangabeys, *Cynomolgus macaques*), ardillas y armadillos. En el caso particular del armadillo, su contacto directo se ha asociado con mayor riesgo de padecer enfermedad de Hansen (Odds ratio (OR) 2) (Deps *et al.*, 2008; Truman *et al.*, 2011). En Suramérica existe una relación espacial entre el hábitat del *Dasybus sabanicola* (cachicamo) y las zonas con mayor número de casos de la enfermedad,

con detección serológica y molecular de *M leprae* en otras especies de armadillo en Brasil (da Silva *et al.*, 2020), hecho que debe ser mejor investigado para aclarar su papel en la prevalencia de la enfermedad.

El mayor factor de riesgo de la enfermedad es la distancia espacial y temporal con el caso índice, lo cual se corresponde con la definición de contacto. El riesgo se incrementa con la cercanía con el caso índice de la siguiente manera: aquellos que viven bajo el mismo techo usando la misma cocina (OR 2,44); los que viven bajo techos separados compartiendo la misma cocina (OR 1,69) y los que viven bajo el mismo techo pero no usan la misma cocina (OR 1,05). El contacto de una persona por más de 6 horas al día por 6 meses con un caso no tratado de Hansen incrementa el riesgo de padecer lepra, en especial si éste es MB (Hegazy *et al.*, 2002; Kerr-Pontes *et al.*, 2006; Hoeven *et al.*, 2008).

### **Caracterización del agente causal y poblaciones susceptibles**

El bacilo de Hansen tiene un diámetro de 0,3 a 0,5 micras, longitud de 4 a 5 micras, esta curvado ligeramente en uno de los extremos y forma aglomerados (globis), lo cual le permite resistir los embates del sistema inmunológico. El bacilo presenta coloración Ziehl Neelsen (ZN+); y tiene un tiempo de duplicación entre 12 y 14 días. En razón del largo periodo de incubación es difícil el cultivo empleando métodos convencionales. En centros de investigación, el bacilo se mantiene en armadillos de 7, 8, 9 y 11 bandas (Aranzazu, 1994).

Desde el año 2000 se dispone de la secuenciación genómica completa del *Mycobacterium (M) leprae* y actualmente se reconoce al *M lepromatosis* como otra especie productora de lepra asociada con la forma difusa de Lucio y fenómenos de Lucio en México y Suramérica. Esta especie dispone de factores de patogenicidad incorporados por plásmidos que se asocian a mayor severidad de la enfermedad (Han *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2015). El descubrimiento de la genómica y proteómica de la bacteria ha abierto el camino al conocimiento de vías metabólicas, factores de patogenicidad, descubrimiento de antígenos y proteínas para elaborar pruebas diagnósticas e

inmunoterapia.

A pesar de que las características del genoma del *M. leprae* son excepcionalmente bien conservadas y altamente clonales, tras los avances en biología molecular se han identificado a través del análisis de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) 4 tipos de micobacterias productoras de Hansen y 16 subtipos, abriendo el campo del estudio molecular y filogenético del bacilo (Monot *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2016). Esto podría explicar su origen, migración y algunas diferencias clínicas de la enfermedad.

Los subtipos de micobacterias productoras de lepra más comunes reportados en Sur América son el 3I (73.8%), 4P (11.6%), 1D (6.9%), 4N (6%), y 4O (1.7%). (Singh *et al.*, 2011). El Instituto de Biomedicina y sus centros regionales de dermatología sanitaria han participado en la recolección de muestras para la caracterización genómica de las micobacterias productoras de lepra en Venezuela, a través de investigaciones realizadas en conjunto con el Dr Paniz-Mondolfi y sus grupos de trabajo y actualmente se participa en la recolección de muestras de casos de recidivas o de difícil diagnóstico para que, en conjunto con el laboratorio del Dr De Waards (IB), su equipo de investigadores y con ayuda internacional se continúe con la caracterización molecular de los tipos de bacilos productores de lepra, que circulan en el país, y se realice un potencial seguimiento de la resistencia bacteriana.

En cuanto a la caracterización genética de poblaciones, hoy en día se considera un punto fundamental para evaluar susceptibilidad genética individual y poblacional. Existen genes ubicados en el cromosoma 6 (6q25, 6q26), y polimorfismos en genes como el de "resistencia natural asociado a la proteína del macrófago-1" (NRAMP1) que se han asociado a susceptibilidad para la lepra, así como polimorfismos en los promotores para los genes del Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) -12, IL-10 asociados a la enfermedad. Los alelos del antígeno leucocitario humano (HLA)-DR2 y DR3 se han asociado a lepra tuberculoide (OR 3,33) y HLA DQ1 a lepra lepromatosa (OR 5,4) (Lázaro *et al.*, 2010; Mazini *et al.*, 2016). Así mismo se han realizado los estudios de variantes de codificación de proteínas en poblaciones

con lepra (Liu *et al.*, 2017). De esta manera, partiendo de la proteína al gen, se puede realizar el análisis integrado de la red de genes de susceptibilidad a la lepra, se puede estudiar la participación de la inmunidad tanto innata como adaptativa y el papel del interferón gamma, la actividad del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas" (NF-kappaB), filagrina, profilagrina (barrera cutánea), citoesqueleto (endocitosis fagocitosis), entre otros, en la enfermedad.

### **Diagnóstico y clasificación de la enfermedad de Hansen**

El diagnóstico de la lepra deberá soportarse con los criterios: clínicos, baciloscópicos, histopatológicos, inmunológicos y en ocasiones con apoyo de la electromiografía (Aranzazu, 1994; Reyes, 2013). Las pruebas de intradermorreacción como la lepromina y el antígeno soluble han caído en desuso por su poca disponibilidad al requerir de la micobacteria, que no es cultivable *in vitro*. La clave para el diagnóstico de lepra MB, en donde hay inadecuada respuesta celular (RC) con aumento en el número de bacterias y anticuerpos, viene dada por el estudio bacilosκόpicos de piel y tejidos coloreados con Ziehl Neelsen (ZN) y la determinación de anticuerpos a través de pruebas serológicas. En lepra PB, en donde hay adecuada RC con poca formación de anticuerpos y escasas bacterias, el diagnóstico constituye un reto, para lo cual se propone la elaboración de nuevas pruebas intradérmicas estandarizadas a partir de componentes de la micobacterias, que pasen a sustituir a la lepromina. En situaciones de difícil diagnóstico se recomienda el análisis de los tejidos empleando pruebas de biología molecular y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A través de la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) se han logrado avances en el descarte de contactos, monitoreo del tratamiento, determinación de genes de resistencia a drogas, descarte de persistencia bacteriana y elaboración de guías de terapias dirigidas.

Se define como caso probable aquel paciente con al menos uno de los dos signos cardinales: (i) pérdida definitiva de la sensibilidad en un parche o mancha

hipo pigmentada o rojiza de la piel; (ii) nervio periférico engrosado o agrandado con pérdida de la sensibilidad y/o debilidad de los músculos alimentados por ese nervio (WHO, 2018).

La OMS considera que la evidencia clínica de uno de estos signos puede sustentar el inicio del tratamiento siempre que el índice de sospecha sea alto, sea contacto de Hansen o provenga de zona hiperendémica. A pesar de ello se recomienda tratar de confirmar el caso con la búsqueda de las bacterias.

Las formas clínicas dependen de la respuesta celular (RC) del individuo ante la penetración del *M. leprae* en el organismo, de tal manera que en la enfermedad de Hansen podemos encontrar un espectro de manifestaciones clínicas que van desde las formas localizadas hasta las diseminadas de la enfermedad.

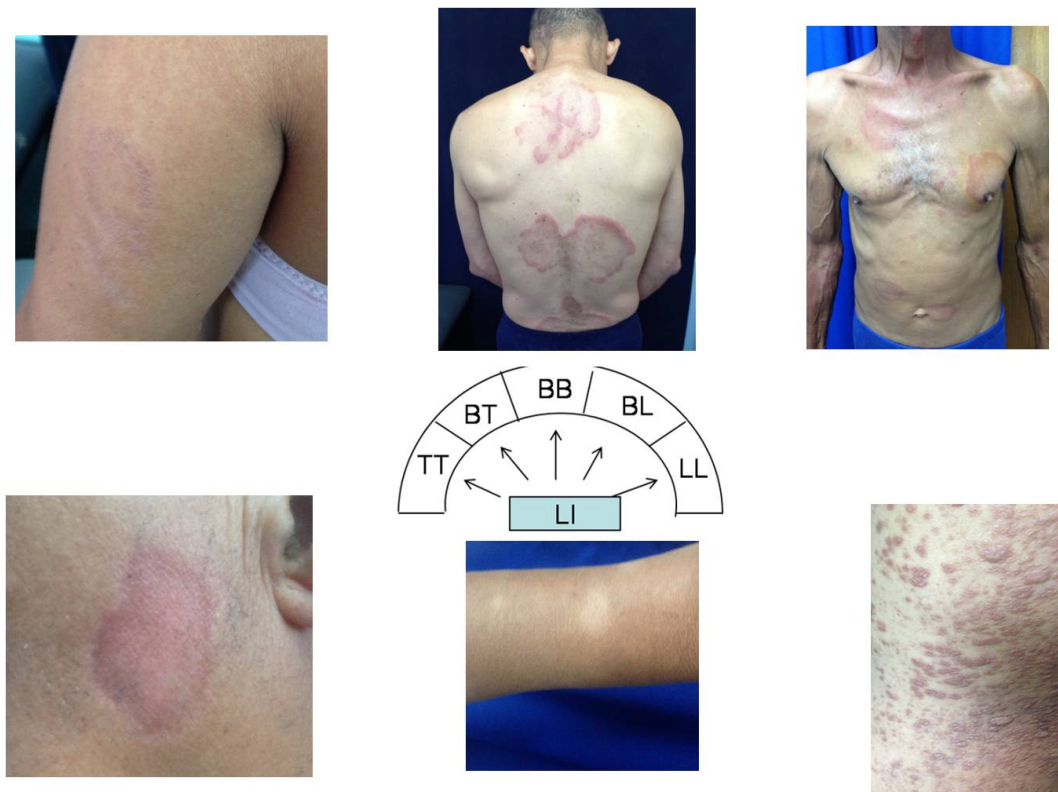
Una de las clasificaciones más importantes es la clasificación inmunológica de Ridley y Jopling (Ridley *et al.*, 1966), la cual correlaciona aspectos clínicos, histopatológicos e inmunológicos y clasifica a la lepra en un espectro que va desde la forma Indeterminada hasta la Lepromatosa (Figura 1).

#### **Lepra Indeterminada (LI):**

Se considera una forma de lepra de inicio en donde los fenómenos inmunológicos no se han definido y por lo tanto la forma clínica tampoco. Se caracteriza clínicamente por la presencia de una o pocas manchas hipo pigmentadas de pocos centímetros de diámetro, generalmente con márgenes mal definidos, trastornos sensitivos y test de histamina anormal. El cuadro histopatológico es un infiltrado inflamatorio linfocitocitario perivascular, perineural y perianexial. Los bacilos, muy escasos, deben ser buscados exhaustivamente en los nervios y anexos, sobretodo en el músculo pilo erector. Los frotis de piel en sitios convencionales y en la lesión son generalmente negativos. Las pruebas RC tanto *in vivo* como *in vitro*, dan resultados variables.

#### **Lepra Lepromatosa (LL):**

Es la forma difusa debida a un defecto de RC, lo cual provoca una multiplicación exagerada de la bacteria y una invasión de la piel, tejido celular subcutáneo y todos los órganos internos excepto



**Figura 1.** Espectro de lepra según Ridley y Jopling.

pulmón y cerebro. Clínicamente se observan lesiones variadas tales como: Infiltrado eritematoso difuso, generalizado, especialmente en la cara, puede haber ataque a los nervios periféricos con daño del nervio que se demuestra por anestesia de las manos, y pies. Se puede ver madarosis. Cuando hay presencia de infiltración difusa con eritema sin nódulos se denomina Lepra de Lucio. La lepra de Lucio se ha asociado principalmente al *M lepromatosis*, y puede llevar a fenómenos periféricos de necrosis en los pacientes. También podemos evidenciar formas clínicas donde predominan nódulos aislados o agrupados en placas de diferentes tamaños pigmentados, duros brillantes con predominio centro facial, con infiltración de pabellones auriculares y depresión en el dorso nasal. Existe invasión progresiva de las mucosas y del tracto respiratorio alto en un 80% de los pacientes, en ocasiones con rinorrea, obstrucción nasal hasta destrucción del hueso propio de la nariz. La laringe y el paladar pueden estar afectados. El ojo puede dar manifestaciones como: conjuntivitis, iridociclitis, uveítis, lagofalmo, ceguera entre otras. Puede haber ginecomastia por atrofia testicular. El cuadro histológico se caracteriza por un

infiltrado macrofágico difuso con la presencia de una banda de colágeno sub-epidérmica indemne. Los macrófagos tienen diferentes grados de vacuolización y están repletos de grandes masas de bacterias. Estas se pueden encontrar en todas las estructuras de la piel y fuera de los macrófagos. Los nervios están infiltrados, pero son reconocibles. La reacción de Mitsuda y el antígeno soluble son negativos y las pruebas *in vitro* de RC son negativas. Hay alta titulación de anticuerpos, principalmente contra el Glicolípido fenólico-1 (GLP-1). Los frotis de piel (linfas) para el bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) son positivos entre 5 y 6+. Además existe otro subtipo de lepra lepromatosa denominada Lepra Histioides con características particulares a nivel histopatológico que la diferencian del resto de los pacientes lepromatosos, con presencia de histiocitos de morfología fusiforme.

#### **Bordeline Lepromatosa (BL):**

Se presentan placas o máculas eritematosas, eritemato-pigmentadas o violáceas, de morfología anular y distribución bilateral. Puede haber hipoestesia o anestesia total sobre todo en el centro de las lesiones. El cuadro histológico se caracteriza

por un granuloma macrofágico con diversos grados de vacuolización y presencia de escasos linfocitos. Coloración de Fite Faraco (FF) de 4 a 5+ con bacilos irregularmente distribuidos. Los frotis bacteriológicos de piel son positivos de 4 a 5+ para BAAR. La reacción de Mitsuda y el antígeno soluble son negativos. Las pruebas *in vitro* de RC son negativas. Se encuentra un alto título de anticuerpos contra el GLP-1.

#### **Borderline Bordeline (BB):**

Las lesiones son intermedias entre LL y Lepra Tuberculoide (LT). Placas rojizas o asalmonadas, ovals o redondas. La típica lesión BB es una placa de centro claro de un borde con infiltración variable, de contorno interno muy bien limitado y externo difuso. Puede haber anestesia variable sobre todo en el centro de la placa. El cuadro histopatológico presenta células epitelioideas difusamente esparcidas en el granuloma sin células gigantes. Macrófagos indiferenciados. Los linfocitos pueden estar presentes, distribuidos irregularmente. Nervios infiltrados pero reconocibles. Frotis de piel para búsqueda de BAAR: 1 a 3+. La reacción de Mitsuda generalmente es negativa, pero en algunos casos pueden ser débilmente positivas. El antígeno soluble es negativo y las pruebas *in vitro* de RC son negativas. Los títulos de anticuerpos contra GLP1 son moderadamente positivos.

#### **Borderline Tuberculoide (BT):**

Presencia de máculas o placas en número variable, más o menos bien limitadas, asimétricas, rojizas, parduscas o hipocrómicas. Pueden ser elevadas en su superficie o con un centro claro. Los nervios periféricos son frecuentemente afectados. Los cortes histológicos demuestran un granuloma de células epitelioideas focalizadas o rodeados de linfocitos con numerosas células gigantes. Los nervios y anexos están infiltrados, pero pueden ser reconocidos. En la coloración de F.F. se observa la presencia de bacilos escasos predominantemente en los nervios. Frotis bacteriológicos de piel para BAAR ligeramente positivos de 1 a 2+ o pueden ser negativos. Reacción de Mitsuda y antígeno soluble variadamente positivas. Pruebas *in vitro* de RC positivas. Los anticuerpos son débilmente positivos.

#### **Lepra Tuberculoide (LT o TT):**

Las lesiones son generalmente únicas. Placas rojizas parduscas y en algunos casos hipocrómicas, redondeadas u ovals, de bordes bien definidos, generalmente de centro regresivo y anestésico. La piel en la lesión es seca, generalmente escamosa, alopecica y con anestesia marcada. El cuadro histológico se presenta como un denso granuloma formado por células epitelioideas muy bien diferenciadas rodeadas por linfocitos o invadiendo éstos el granuloma. Hay presencia de células gigantes de tipo Langerhans. Los nervios y anexos están muy infiltrados y la mayoría de las veces son irreconocibles. A la coloración de F.F. no se encuentran bacilos o son muy escasos. Frotis bacteriológico de piel: negativo. Reacción de Mitsuda, antígeno soluble y pruebas *in vitro* de la RC positivas. Los anticuerpos contra GLP-1 son muy débiles o no se encuentran.

#### **Lepra neural pura**

Es una forma de la enfermedad que se ve principalmente en zonas hiperendémicas y está caracterizada por el compromiso de los nervios periféricos en ausencia de signos cutáneos u otros signos sistémicos. Las alteraciones neurológicas son variables: neuropatía sensitiva o sensitivo motora, acompañada o no de alteraciones tróficas del territorio inervado, o de nervios palpables. Algunos autores consideran a este tipo de lepra para su clasificación dentro de las indeterminadas.

La micobacteria puede afectar cualquier órgano con sistema retículo-endotelial, excepto el cerebro y pulmón, y cuando esto ocurre sin manifestaciones predominantes en piel, puede dar origen a la lepra visceral.

La OMS utiliza una clasificación operativa de la lepra y la divide en MB y PB (WHO, 2016). Se considerarán pacientes PB aquellos que presenten menos de 5 lesiones clínicas sugestivas de Hansen, y a quienes no se le identifiquen por ningún método bacteriológico la presencia de bacilos (en linfas o biopsias de tejido). Se considerarán pacientes MB a aquellos con 5 o más lesiones clínicas sugestivas de Hansen, o que presenten afectación sensitiva o

motora (neuritis pura, o cualquier número de lesiones cutáneas y neuritis) o aquellos a los que se le identifiquen bacilos con cualquier estudio bacteriológico (independientemente del número de lesiones).

### **Fenómenos reaccionales**

Los pacientes con enfermedad de Hansen pueden presentar FR que corresponden a complicaciones inflamatorias que pueden aparecer, antes, durante o después del tratamiento antihanseniano. Existen 2 tipos:

Tipo I: ocurren principalmente en las formas borderline. La destrucción del bacilo produce eritema y edema de las lesiones preexistentes o la generación de nuevas lesiones. El estado general del paciente no se compromete y puede haber un grado variable de daño neural. Existen 2 formas de presentación: el fenómeno de reversión (que es el más usual) se caracteriza por una mejoría inmune que lleva a los pacientes hacia formas más paucibacilares de la enfermedad, con reducción de la carga bacilar; y los fenómenos de lepromatización en donde el paciente presenta un deterioro inmune que lo lleva a un incremento del índice bacilar.

Tipo II: están relacionadas con pacientes MB, en los cuales la respuesta celular está ausente o deprimida. Consiste en una reacción de hipersensibilidad tipo III. Las lesiones pueden ser esporádicas o convertirse en crónicas, extenderse e involucrar diferentes órganos persistiendo por muchos años. Existen varias formas de presentación: de los FR tipo II:

1.- Eritema nodoso leproso: caracterizado por nódulos eritematosos, dolorosos generalizados en ocasiones acompañados de fiebre o toque del estado general.

2.- Eritema polimorfo leproso: clínicamente el paciente presenta placas eritematosas violáceas en forma de diana, o coexistencia de placas, nódulos, vesículas y ampollas en un momento histórico. Suele acompañarse de compromiso del estado general.

3.- El fenómeno de Lucio se manifiesta por la aparición de manchas y placas suavemente induradas o totalmente planas, dolorosas, ligeramente violáceas con halo eritematoso. Esta reacción puede acompañarse de artritis, nefritis y esplenomegalia,

ulceración extensa y necrosis. Se evidencia vasculitis con presencia del bacilo en la pared del vaso. Las lesiones requieren semanas para su curación a pesar del tratamiento y dejan cicatrices atróficas, que en ocasiones llevan a la amputación de zonas distales. Predominan en las extremidades inferiores y superiores y son menos usuales en tronco y cara.

4.- Cualquier órgano puede verse afectado por el depósito de complejos antígeno anticuerpo produciendo vasculitis, uveítis, adenitis, artritis, nefritis, hepatitis, orquitis, neuritis, entre otras.

### **Otras pruebas diagnósticas**

La OMS promueve la elaboración de nuevas pruebas diagnósticas que permitan el diagnóstico precoz, en especial en pacientes PB y contactos. La prueba ideal no existe actualmente. Se busca que sea de fácil aplicación, rápida, económica, poco invasiva y que pueda ser llevada a trabajos de campo en grandes poblaciones.

Se ha investigado el uso de marcadores lipídicos a través de improntas de piel (1 cm) en placas de silicona analizadas por espectrometría de masa, (ESI-HRMS) en lepra (Lima *et al.*, 2015), así como herramientas adicionales histopatológicas como son la inmuno histoquímica utilizando la proteína S100 como marcador de las células de Schwann de los nervios periféricos para facilitar la identificación del daño neural (Tirumalae *et al.*, 2014). Además se ha utilizado el método de citología por punción con aguja fina de lesiones de pacientes con Hansen como una herramienta menos invasiva, obteniéndose una buena correlación con la histopatología (78%-90%) (Ray *et al.*, 2014). En el Instituto de Biomedicina, en conjunto con los estudiantes de Citotecnología de la Universidad Central de Venezuela, se han realizado esfuerzos para utilizar nuevos métodos de tinción para la bacteria.

El estudio serológico de los pacientes con lepra y la PCR son sin lugar a dudas, uno de los puntos más investigados actualmente. Desde la utilización de ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA) para determinar anticuerpos contra el GLP-1 en casos y contactos, han surgido nuevas pruebas diagnósticas serológicas que buscan un diagnóstico precoz y estudio de contactos. Se han utilizado proteínas de la bacteria tales como

ML0308, ML2498, ML0405 y ML2331, proteínas de fusión (LID-1), conjugados combinando GLP-1 sintético (ND) con proteína de fusión, ND-o-LID, mejorando la sensibilidad diagnóstica en pacientes con lepra y con eficacia corroborada en múltiples países suramericanos, y en zonas hiperendémicas. El Instituto de Biomedicina ha sido pionero en la implementación de dichas pruebas en Venezuela gracias al trabajo conjunto de la Dra Rada y el Dr Duthie, investigador reconocido a nivel mundial en la elaboración de nuevas pruebas serológicas en Hansen, logrando diversas publicaciones que avalan su utilidad (Duthie *et al.*, 2007; Geluk *et al.*, 2011; Rada *et al.*, 2012; Duthie *et al.*, 2014; Rada *et al.*, 2017; Rada *et al.*, 2019).

Además se ha diseñado una prueba rápida ND-o-LID-1 cuantificada por lector de Smart Phone que inmoviliza 2 antígenos en membrana de nitrocelulosa y detecta Inmunoglobulina (Ig) M e IgG de manera cualitativa y cuantitativa en 20 min después de adicionar el suero, con una Sensibilidad de 87% en MB y 21,2% en PB, con una especificidad 96.1%, valor predictivo positivo 94% y negativo 97% (Vaz Cardoso *et al.*, 2013).

La PCR ha sido utilizada para el diagnóstico de casos mejorando la sensibilidad diagnóstica en PB al 80% e inclusive detectando micobacterias en un 44% de pacientes con lesiones únicas. La técnica de tiempo real permite medir efectividad del tratamiento cuantificando carga bacteriana y por transcriptasa reversa se puede abordar la viabilidad bacteriana (al detectar ARN), persistencia bacteriana y recaídas.

### **Tratamiento de la enfermedad de Hansen**

Como norma el tratamiento anti-hanseniano debe ser con más de una droga para evitar resistencia bacteriana. Existen 2 tipos de tratamiento: el estandarizado recomendado por la OMS y la terapia alternativa.

La OMS garantiza el acceso gratuito a los medicamentos a todo paciente que se encuentre bajo PQT estandarizada, que actualmente consiste en el esquema multibacilar (PQTMB), con una forma de presentación para adultos y otra para niños de 10 a 14 años. En los menores de 10 años o de bajo peso, la dosis debe ser ajustada al peso corporal. Los

medicamentos vienen organizados en blíster y cada uno dura 28 días y debe ser supervisada la primera toma de medicamento de cada blíster. El tratamiento consta de 3 drogas: rifampicina, clofazimina y DDS y se administra por 6 meses en PB y por 12 meses en MB. Esto representa un cambio con respecto al tratamiento estándar anterior para la lepra PB, que era la rifampicina y DDS (PQTPB) durante 6 meses, debido a algunas pruebas que indicaron mejores resultados clínicos con un régimen de 3 medicamentos (PQTMB), simplificando el tratamiento, con mejor adhesión del paciente (WHO, 2018).

En estudio realizado en el Instituto de Biomedicina (Soucre *et al.*, 2018), se evidenciaron efectos adversos a la PQT en el 29% de los pacientes, predominando en las mujeres y en formas multibacilares. Los principales efectos adversos encontrados fueron anemia (11%) y cefalea, atribuibles al DDS que mejoraron tras su eliminación.

Existen varias terapias alternativas que se utilizan en pacientes que rechacen algún medicamento, desarrollen efectos adversos graves o resistencia bacteriana. Adultos que rechacen clofazimina, se le administra rifampicina 600 miligramos (mg), una vez al mes, supervisada., DDS 100 mg. al día, autoadministrada. Etionamida o protionamida 250-375 mg al día, autoadministrada. También se puede sustituir la rifampicina en la PQT por claritromicina 500 mg al día en pacientes que no toleren rifampicina, teniendo en cuenta el potencial gastrolesivo de la claritromicina. Otros medicamentos empleados, son las quinolonas, minociclina, pero su efectividad no se equipara a la PQT y deben ser reservadas a casos particulares. Existe el esquema ROM (rifampicina 600 mg, ofloxacin 400 mg y minociclina 100 mg dosis única) que se puede utilizar en pacientes con lesión única PB. La terapia alternativa no está recomendada en las embarazadas ni en niños. Todos los medicamentos de la PQT estandarizada pueden utilizarse en el embarazo, monitorizando los posibles efectos adversos tales como la anemia en el caso del DDS. En pacientes con tuberculosis (TB) se dosifica la rifampicina acorde al esquema de TB y se mantienen el resto de los medicamentos. En el caso de pacientes inmunosuprimidos,

se mantiene la misma terapia teniendo en cuenta las interacciones con los antiretrovirales en pacientes con el virus de Inmunodeficiencia adquirida (VIH) y evitando el DDS en pacientes que usen profilaxis con sulfas. Para la lepra resistente a la rifampicina, las pautas recomiendan el tratamiento con al menos dos medicamentos de segunda línea (claritromicina, minociclina o quinolona) más clofazimina por día durante 6 meses, seguidos de más uno de estos medicamentos por 18 meses adicionales. Cuando la resistencia a la ofloxacina también está presente, no debe usarse una fluoroquinolona como parte del tratamiento de segunda línea. El régimen de elección en tales casos consistirá en 6 meses de claritromicina, minociclina y clofazimina seguidos de claritromicina o minociclina más clofazimina durante 18 meses adicionales.

### **Prevención de la lepra mediante quimioprofilaxis**

Las pautas de la OMS recomiendan el uso de una dosis única de rifampicina como tratamiento preventivo para los contactos de pacientes con lepra (adultos y niños a partir de 2 años), después de excluir la enfermedad de lepra y TB y en ausencia de otras contraindicaciones. En Venezuela no se dispone actualmente de rifampicina para dicho fin. Las dosis recomendadas son dosis única de 600 mg en pacientes mayores de 15 años, 450 mg de 10 a 14 años, 300 mg de 6 a 9 años, con peso mayor de 20 kilogramos (kg) y con menos de 20 kg, se le suministra 10-15 mg por kg de peso (WHO, 2018).

Con respecto a la prevención con vacunas, no existen recomendaciones estandarizadas al respecto. A pesar de ello la literatura concuerda que:

1.- La vacuna con el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) al nacer, es eficaz para reducir el riesgo de lepra; por lo tanto, su uso debe mantenerse al menos en todos los países o entornos con alta carga de lepra (buena calidad de la evidencia) (WHO, 2018).

2.- La efectividad de la revacunación con BCG (segunda dosis de BCG) no está clara aún (Singh, 2006; WHO, 2018). En el instituto de Biomedicina se realizó un estudio que observó una correlación inversa entre el tamaño de la cicatriz de BCG y la severidad de la

Enfermedad de Hansen, evidenciándose formas más severas en aquellos pacientes sin cicatriz presente (Jiménez-Pérez *et al.*, 2019).

3.- La evidencia indica la eficacia de *M. indicum pranii* en la prevención de la lepra (calidad de evidencia moderada) (WHO, 2018). Además existen una serie de vacunas actualmente en período experimental que requieren mayores estudios para su recomendación (*M vaccae*, ICRC, *M habana* y *M leprae* muerta por calor, Lepvax entre otras). A pesar de ello consideramos que desde los inicios de los fundamentos de la inmunoterapia e inmunoprofilaxis de la lepra en Venezuela por el Dr Convit (Convit *et al.*, 1983), ésta herramienta sigue vigente y es necesario mantener la investigación en este tema para lograr el control de la enfermedad.

### **Tratamiento de la reacción lepromatosa**

**FR tipo I:** El tratamiento de elección es la prednisona o prednisolona a dosis de 0,3 a 1 mg por kg de peso día. Se puede utilizar como alternativa dexametasona 5-3mg por día, clofazimina por su efecto anti-inflamatorio 300 mg diarios disminuyendo o espaciando la dosis de acuerdo a la evolución del paciente.

**FR tipo II:** No está indicado suspender la terapia antilepromatosa, la droga de elección es la talidomida. Se le atribuyen los siguientes efectos: Antagonizan mediadores químicos de la inflamación, inhibe a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, disminuye niveles de TNF-alfa y la proliferación de inmunoblastos, inhibe la quimiotaxis de los polimorfonucleares y la actividad y fagocitosis del monocito macrófago, estabiliza la membrana lisosomal. La dosis habitual es de 100 a 400 mg por día o 6 mg por kg de peso por día, pero la dosis debe ser gradualmente descendida, de acuerdo a la evolución del paciente. Efectos adversos: teratogénesis, neuropatía periférica, edema distal de manos unilateral, constipación o diarrea, cansancio, obnubilación, erupción cutánea, sequedad de boca. Está contraindicada absolutamente en mujeres embarazadas y en edad fértil a menos que estén esterilizadas y hay que vigilar su efecto protrombógeno. Se ha descrito además el uso de esteroides sistémicos, methotrexate, azatioprina,

pentoxifilina, terapia biológica anti TNc- $\alpha$  acorde a la disponibilidad de los medicamentos y evolución del paciente.

### **Otras consideraciones del tratamiento antihanseniano**

El control de la lepra se basa en un adecuado tratamiento multidroga lo cual limita la aparición de patógenos resistentes. (WHO, 2018). A pesar de ello se recomienda un monitoreo periódico del genotipo de la micobacteria para detectar la aparición de resistencia. En contraste con la TB, la prevalencia de resistencia primaria y secundaria en lepra es poco conocida. Dado la complejidad del método clásico de determinación de resistencia por inoculación en pata de ratón, el progreso de la biología molecular, el conocimiento del genoma y mecanismos moleculares de resistencia bacteriana ofrecen una oportunidad valiosa para determinar susceptibilidad a las drogas a través de la técnica de PCR (Williams *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014; Chauffour *et al.*, 2018).

Se han realizado estudios por PCR en países con alta prevalencia de la enfermedad para determinar resistencia a los medicamentos utilizados en la quimioterapia. La resistencia al DDS, rifampicina, y ofloxacin involucra la sustitución de aminoácidos determinados por mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a estas drogas. Se han estudiado mutaciones en los genes que codifican a la subunidad beta de la ARN polimerasa bacteriana (rpo $\beta$ ), en la resistencia a rifampicina, mutaciones en el gen folP1 para resistencia a DDS, y en el gen de la subunidad A de la ADN girasa (gyrA) para la ofloxacin. Por definición la determinación de resistencia es posible a través de un abordaje temprano a través del estudio en la secuenciación del ADN bacteriano. Se ha reportado resistencia al DDS en un 8-10%, a la rifampicina en un 1% y a la ofloxacin en un 1%. El porcentaje de resistencia antibacteriana se incrementa con los años de seguimiento de la enfermedad tras el alta y en recaídas (7.0 % vs 25.7 %). El subtipo 3 SNP de lepra es asociado más frecuentemente a recaídas, y es el que predomina en Suramérica. Más del 70% de las mutaciones en resistencia se asocian a recaídas (Guerrero *et al.*, 2014; Beltrán-Alzate, 2016).

En Venezuela, hasta el año 2016 tras la evaluación de 197 casos de Hansen, sólo se ha encontrado 1 caso de resistencia bacteriana asociada al DDS (Singh *et al.*, 2011). Los casos de recaída de la enfermedad para el año 2017 en Venezuela alcanzaban el 8%, y se han identificado pacientes del subtipo 3, por lo que se recomienda organizar la vigilancia rutinaria de la resistencia antimicrobiana empleando métodos moleculares simples, posibles a ser realizados con el apoyo de la OMS, para poder detectar a tiempo este fenómeno.

En un estudio realizado en el Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, en pacientes con Enfermedad de Hansen MB, durante el período 2010-2013 a través de la evaluación histopatológica de biopsias de piel coloreadas con FF, se pudo evidenciar la presencia de formas sólidas asociadas a viabilidad bacteriana en un 48% de los pacientes tras un año de tratamiento recomendado por la OMS (Suarez *et al.*, 2014). Es por ello que toma valor el estudio de PCR, no solo para evaluar resistencia bacteriana sino para poder realizar el correcto seguimiento de manera más objetiva, de la viabilidad bacteriana después del tratamiento, y de la curación del paciente o aparición de recidivas. A raíz de estos hallazgos consideramos que la terapia debe ser individualizada y se debe realizar un correcto seguimiento de los pacientes, con optimización de los criterios de alta, en donde un año en ocasiones, no es suficiente para la erradicación del bacilo.

### **CONCLUSIONES**

La lepra es una enfermedad milenaria con grandes avances en la comprensión de la enfermedad, en especial en lo que se refiere al conocimiento del agente causal y elaboración de nuevas técnicas diagnósticas y de seguimiento del paciente. El Instituto de Biomedicina ha sido por excelencia un centro de formación, diagnóstico y manejo de la enfermedad de Hansen. Para obtener una visión de futuro, debemos volver al pasado con una institución fuerte para lo cual es fundamental el trabajo conjunto del Ministerio-Hospital Vargas, la UCV, OPS y OMS, con enlaces internacionales con otros grupos y centros

de investigación en donde todos con nuestro trabajo, somos necesarios e importantes para conseguir las metas propuestas por la OMS para la eliminación de la enfermedad. Las líneas de trabajo que maneja la institución se enfocan actualmente en tratar de optimizar el registro, reporte y seguimiento de casos, llevar el tratamiento estándar y anti-reaccional a los pacientes, y mantener la investigación en los aspectos epidemiológicos, microbiológicos, serológicos y genéticos de la bacteria, sin descuidar la docencia y formación necesaria para crear una generación de relevo para el control de la lepra.

## REFERENCIAS

- ARANZAZU N. (1994). "Enfermedad de Hansen: Etiología, Clínica y Clasificación". *Dermatol Venez* 32(4):145-151.
- ARANZAZU N, PARRA J, CARDENAS M, RADA E, et al. (2012). "Cojedes: a leprosy hyperendemic state". *Int J Dermatol* 51:186-194.
- BELTRAN-ALZATE C, LOPEZ DIAZ F, ROMERO-MONTOYA M, et al. (2016). "Leprosy Drug Resistance Surveillance in Colombia: The Experience of a Sentinel Country". *PLoS Negl Trop Dis* 10(10): 1-12.
- CHAUFFOUR A, LECORCHE E, REIBEL F, MOUGARI F, et al. (2018). "Prospective study on antimicrobial resistance in leprosy cases diagnosed in France from 2001 to 2015". *Clin Microbiol Infect* 24 (11): 1-4.
- CONTRERAS M, CRESPO L, RADA E, BORGES R, ARANZAZU N. (2014). "Características Clínicas, Epidemiológicas, Histológicas y Bacteriológicas en Hansen Infantil. Servicio Central de Dermatología Instituto de Biomedicina Dr Jacinto Convit". *Dermatol Venez* 52; 26-31.
- CONTRERAS M, LÓPEZ E, HERRERA R, et al., (2011). "Lepra importada y su dificultad en el medio actual: a propósito de 7 casos". *Actas Dermosifiliogr* 102 (2):106-113.
- CONVIT J, ARANZAZU N, ZUÑIGA M, URLICH M, et al. (1983). "Immunotherapy and immunoprophylaxis of leprosy". *Lepr Rev* 47S-60S.
- CONVIT J, AVILAN JM, DIAZ D, ULRICH M, et al. (1999). "Control de la lepra en Venezuela después de más de cinco décadas de desarrollo." *Fontilles.Revista de Leprología* 22:145-162.
- CORTÉS S, RODRÍGUEZ G. (2004). "Leprosy in Children: Association between Clinical and Pathological Aspects". *J Trop Pediatr* 50:12-15.
- DA SILVA FERREIRA J, DE CARVALHO FM, VIDAL PESSOLANI MC, DE PAULA ANTUNES JMA, et al. (2020). "Serological and molecular detection of infection with *Mycobacterium leprae* in Brazilian six banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*).*Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 68:101397.
- DAS M, CHAITANYA V, KANMANI K, RAJAN L, EBENEZER M. (2016). "Genomic diversity in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy cases in South India". *Infect Genet Evol* 45:285-289.
- DEPS PD, ALVES BL, GRIPP CG, ARAGAO RL, et al. (2008). "Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study". *Indian J Dermatol Venereol Lepr* 74(4):338-342
- DI MARTINO B, RODRIGUEZ M, KNOPFELMACHER O, et al. (2011). "Lepra infantil: Presentación de un caso". *Dermatol Online J* 17:13.
- DUTHIE MS, GOTO W, IRETON GC, REECE ST, et al. (2007). "Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy". *Clin Vac Immunol* 14:1400-1408.
- DUTHIE MS, BALAGON MF, MAGHANOY A, ORCULLO FM, et al. (2014). "Rapid Quantitative Serological Test for Detection of Infection with *Mycobacterium leprae*, the Causative Agent of Leprosy". *J Clin Microbiol* 52 : 613-619.
- DUTHIE MS, RAYCHAUDHURI R, TUTTERROW YL, et al. (2014). "A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate". *Diagn Microbiol Infect Dis.*79(2):233-239.
- GELUK A, DUTHIE MS, SPENCER JS. (2011). "Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease". *Lepr Rev* 82(4):402-421.
- GUERRERO M, COLORADO C, TORRES J, LEÓN C. (2014). "Is drug-resistant *Mycobacterium leprae* a real cause for concern? First approach to molecular monitoring of multibacillary Colombian patients with and without previous leprosy treatment". *Biomédica* 34(Supl.1): 137-147.
- GUEVARA J, ORTEGA-MORENO M, RODRÍGUEZ F, SOSA R, (2017). "Actualización epidemiológica de la lepra en Venezuela. Período 2006-2016". *Dermatol Venez* 55 (1):21-25.
- HAAS C, ZINK A, PÁLFI G, et al. (2000). "Detection of Leprosy in Ancient Human Skeletal Remains by Molecular Identification of *Mycobacterium leprae*". *Am J Clin Pathol* 114: 428-436.
- HAN XY, SEO YH, SIZER KC, et al. (2008). "A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy". *Am J Clin Pathol* 130:856-864.
- HANSEN GHA. (1874). "Spedalshedens arsager". *Norsk Magazin for Laegervidenskaben. (Suplem)* 4: 76-79; reprinted in translation in PALLAMARY P. (1955). "Causes of leprosy". *Int J Lepr* 23,307-309
- HEGAZY A, ABDEL-HAMID I, AHMED E, et al. (2002). "Leprosy in a high-prevalence Egyptian village: epidemiology and risk factors". *Int J Dermatol* 41:681-686.
- HOEVEN TA, FISCHER EA, PAHAN D, RICHARDUS JH, (2008). "Social distance and spatial distance are not the

- same, observations on the use of GIS in leprosy epidemiology". *Epidemiol Infect* 136(12):1624-1629.
- JIMENEZ-PEREZ R, OLIVER M, CRESPO L. (2019). "BCG y enfermedad de Hansen; estudio clínico epidemiológico". *Rev Argent Dermatol* 100: 1-14.
- KERR-PONTES LR, BARRETO ML, EVANGELISTA CM, RODRIGUES LC, et al. (2006). "Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study". *Int J Epidemiol* 35(4):994-1000.
- LAHIRI R, KRAHENBUHL JL. (2008). "The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle". *Lepr Rev* 79(4):401-409.
- LÁZARO FP, WERNECK RI, MACKERT CC, COBAT A, et al. (2010). "A Major Gene Controls Leprosy Susceptibility in a Hyperendemic Isolated Population from North of Brazil". *J Infect Dis* 201(10): 1598-1605.
- LIMA DE OLIVEIRA E, DE MACEDO CS, ESTEVES CZ, et al. (2015). "Skin imprinting in silica plates: a potential diagnostic methodology for leprosy using high-resolution mass spectrometry". *Anal Chem* 87(7):3585-3592.
- LIU H, WANG Z, LI Y, YU G, et al. (2017). "Genome-Wide Analysis of Protein-Coding Variants in Leprosy" *J Invest Dermatol* 137(12):2544-2551.
- MARTINEZ AN, TALHARI C, OZÓRIO MORAES M, TALHARI S. (2014). "PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic". *PLoS Negl Trop Dis* 10( 8):1-8.
- MAZINI PS, ALVES HV, REIS PG, LOPES AP, et al. (2016). "Gene Association with Leprosy: A Review of Published Data". *Front Immunol* 6: 1-17
- MONOT M, HONORÉ N, GARNIER T, ZIDANE N, et al. (2009). "Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*". *Nature Genetics* 41 (12):1282-1289.
- OVALLES V, GOUDET C, SAENZ A, CRESPO L, ARANZAZU N. (2010). "Calidad de vida en familiares de pacientes con Enfermedad de Hansen". *Dermatol Venez* 48:17-20.
- PAULA VAZ CARDOSO L, DIAS RF, FREITAS AA, et al. (2013). "Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology". *BMC Infectious Diseases* 13:49-59
- RADA E, DUTHIE MS, REED SG, ARANZAZU N, CONVIT J, (2012). "Serologic follow-up of IgG reponses against recombinant mycobacterial proteins ML405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 90-94.
- RADA E, DUTHIE MS, BELLORIN D, MORALES S, CRESPO L, (2017). "Clinical presentation and serum antibody reactivity of leprosy patients attending a dermatology clinic in Caracas, Venezuela". *Lepr Rev* 88:131-141.
- RADA E, FERNANDEZ M, ARANZAZU N, et al. (2019). "Respuesta serológica frente a marcadores micobacterianos en una zona hiperendémica de lepra. Venezuela (Años 2008-2011)". *Dermatol Venez* 57(1): 41-50.
- RAY R, MONDAL RK, PATHAK S. (2014). "Benefits and limitations of fine needle aspiration cytology in the diagnosis and classification of leprosy in primary and secondary healthcare settings". *Cytopathology* 26(4): 238-243.
- REYES O. (2013). "Lepra y afecciones relacionadas". Editorial Creser publicidad 2013 C.A.2010. Primera edición. Capitulo 1,2,10,15.
- RIDLEY DS, JOPLING WH. (1966). "Classification of leprosy according to immunity; a five group system". *Int J Lepr* 34(3):255-273.
- ROBBINS G, TRIPATHY V, MISRA V, MOHANTY RK, et al. (2009). "Skeletal Evidence for Leprosy in India by the Second Millenium B.C". *Nat prec* 4.10.1038/NPRE.2009 2745.1.
- SERVICIO AUTÓNOMO INSTITUTO DE BIOMEDICINA. SAIB. (2018). "Estadísticas del Servicio Autónomo de Biomedicina Jacinto Convit. Venezuela". MPPS.
- SILVA DR, IGNOTTI E, SOUZA-SANTOS R, HACON SDE S, (2010). "Hansen's disease, social conditions, and deforestation in the Brazilian Amazon". *Rev Panam Salud Pública* 27(4):268-75.
- SINGH M, STEINMAUS C, HO C, et al. (2006). "The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis". *Lancet Infect Dis* 6:162-170.
- SINGH P, BUSSO P, PANIZ-MONDOLFI A, ARANZAZU N, et al. (2011). "Molecular Drug Susceptibility Testing and Genotyping of *Mycobacterium leprae* Strains from South America". *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 55:2971-2973.
- SINGH P, BENJAK A, SCHUENEMANN VJ, HERBIG A, et al. (2015). "Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*". *Proc Natl Acad Sci USA* 112(14):4459-64.
- SOUCRE N, MARTINEZ I, CRESPO L, GUEVARA J, OLIVER M. (2018). "Reacciones Adversas al tratamiento de la enfermedad de Hansen con poliquimioterapia. Estudio clínico y epidemiológico. Instituto de Biomedicina. Caracas. Periodo 2014-2015". *Dermatol Venez* 56; 49-54.
- SUARÉZ A, ORTEGA F, SOSA R, REYES JAIMES O, OLIVER M, CRESPO L, ARANZAZU N. (2014). "Seguimiento bacteriológico de los pacientes con Hansen multibacilar, tras completar el tratamiento antibacteriano. ¿Es un año de tratamiento suficiente?". *Dermatol Venez* 52 (2): 15-21.
- TIRUMALAE R, STANY A, SHANUBHOGUE S, YELIUR IK, (2014). "S-100 immunostaining in the distinction of borderline tuberculoid leprosy from other cutaneous granulomas". *Indian J Dermatol* 59 (4): 421.
- TRUMAN RW, SINGH P, SHARMA R, et al. (2011). "Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States". *N Engl J Med* 364:1626-1633.
- WEN Y, YOU YG. , YUAN L, et al. (2014). "Evaluation of Novel Tools to Facilitate the Detection and Characterization of Leprosy Patients in China". *Biomed Res Intl* 371828.
- WHO. (2016). "Estrategia mundial para la lepra 2016-2020" p1-106.
- WHO. (2018). "Directrices para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la lepra". p. 1-89.
- WHO. (2019). "Global leprosy update, 2018; moving towards a leprosy-free world". *Wkly Epidemiol Rec* 94; 389-411.
- WILLIAMS D, GILLIS T. (2012). "Drug-resistant leprosy: Monitoring and current status". *Lepr Rev* 83: 269-281.
- ZULUETA A. (1994). "La lepra. Evolución histórica, epidemiológica y medidas de control". *Dermatol Venez* 32: 181-190.

# Factores de riesgo en lepra

**Teresa Rivera Vidal<sup>1</sup>**

tererive2@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6118-9869>

**Noris Rodríguez<sup>1</sup>**

nmrodric@gmail.com

**Henry Oviedo<sup>1</sup>**

henryovied@gmail.com

**José Avilan Rovira<sup>1</sup>**

**Rafael Borges<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Covit", Universidad Central de Venezuela  
- Ministerio del Poder Popular para la Salud

## RESUMEN

La lepra es una enfermedad infectocontagiosa, granulomatosa, crónica, no hereditaria; causada por el "bacilo de Hansen". En Venezuela tenemos varios estados que presentan tasas de prevalencia para lepra por encima de los niveles de eliminación estipulados; tales como es el caso de los estados Apure, Cojedes, Barinas y Portuguesa. En estos estados hiper endémicos se realizó un estudio explicativo y correlacional, un estudio de casos y controles con la finalidad de evaluar los posibles factores de riesgo. Se realizó un análisis univariado y a las variables significativas se le realizó una regresión logística. Se estudiaron como variables la edad, género, cicatrices de vacunación con BCG, antecedentes familiares de Hansen, hacinamiento, ingesta de ciertos alimentos, condiciones de la vivienda y servicios básicos. Los resultados obtenidos señalan que los factores de riesgo significativos en el análisis multivariado son: familiares con antecedentes de Hansen, hacinamiento y carencia de servicios básicos tales como electricidad, teléfono, agua, disposición de excretas. Como factores protectores, la vacunación con BCG y alimentación adecuada.

**Palabras clave:** Lepra; Hansen; Prevalencia; BCG; Factores de riesgo.

## RISK FACTORS IN LEPROSY

### ABSTRACT

Leprosy is an infective contagious, granulomatous, chronic, non-hereditary disease; caused by the "Hansen's bacillus." In Venezuela we have several states that have prevalence rates for leprosy above the stipulated elimination levels; such as the Apure, Cojedes, Barinas and Portuguesa states. In these hyper endemic states, an explanatory and correlate study was conducted, a case and control study in order to evaluate possible risk factors. A univariate analysis was performed and also a logistic regression with the significant variables. Age, gender, BCG vaccination scars, Hansen's family history, overcrowding, intake of certain foods, housing conditions and basic services were studied as variables. The results indicate that the significant risk factors in the multivariate analysis are: family members with Hansen's background, overcrowding and lack of basic services such as electricity, telephone, water, excreta disposal. As protective factors; vaccination with BCG and adequate alimentation were found.

**Keywords:** Leprosy; Hansen; Prevalence; BCG; Risk factors.

## INTRODUCCION

La primera descripción auténtica de la lepra corresponde a los hindúes, los cuales la designan como Kushtha, que significa “corroerse” en sanscrito, descrita en el libro Sushruta Sanshita en el año 600 A de C; especifica de manera clara y precisa los síntomas de la enfermedad. Por tales evidencias históricas el medico historiador asiático Zumbaco Pacha, afirma que el Asia Central ha sido la cuna de la lepra, a partir de la India y de allí se propagó hacia el Oeste y el Este, antes de la era cristiana. (OPS, 2002; Terrones *et al.*, 1987) Europa sufrió entre los siglos XI y XIV el azote de la lepra, contribuyendo las cruzadas a su rápida y extensa transmisión, causando grandes estragos. Para la fecha del descubrimiento de América, la lepra era una enfermedad extendida en países como España, Portugal, Francia, Holanda, Inglaterra, los cuales fueron los más vinculados con la conquista americana y es así como la lepra llega con los enfermos, que para escapar de su situación social, hacen uso de todos los medios para enrolarse en las expediciones conquistadoras de un nuevo mundo alejado, donde esperan encontrar sosiego y libertad, y quizás hasta la posible curación a sus males (Aranzazu, 1994).

En Venezuela, la lepra fue introducida en los primeros años de la conquista y el primer caso se describe para 1626 en la persona del Capitán general de la provincia Don Pedro Gutierrez de Lugo.

Pasa un largo periodo de 200 años en que no se tiene información de su presencia, al menos, para dar origen a documentación del problema. En el año 1873, Armauer Hansen descubre en el campo de la investigación científica, el *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), conocido desde entonces como “bacilo de Hansen”, el cual es un bacilo acido-alcohol resistente (AAR), y es el causante de la lepra, la cual es una enfermedad infecto-contagiosa, granulomatosa, crónica, no hereditaria y aunque para propósitos prácticos se sigue considerando a la lepra como una enfermedad exclusivamente humana, parece estar definitivamente demostrada la existencia de lepra natural en otros animales, lo que ha llevado inclusive a la consideración de la lepra como una zoonosis. (Aranzazu, 1994; Zulueta, 1994). La lepra es una

enfermedad altamente infecciosa de baja patogenicidad; la aparición o no de la enfermedad está íntimamente relacionada con la respuesta inmunológica celular del huésped. La resistencia dependerá de la calidad de la respuesta inmunológica, específicamente dependerá de los mecanismos de la inmunidad mediada por células, de la cual es responsable la expansión clonal mediada por linfocitos T (Ulrich, 1994; Ulrich, 1997).

En cuanto al contagio; este se realiza a través del contacto enfermo-huésped sano susceptible, sin haberse comprobado firmemente la presencia de vectores, a pesar que se han encontrado bacilos AAR en artrópodos e insectos provenientes tanto de zonas endémicas como no endémicas. Las observaciones realizadas sobre incidencia entre personas en contacto con enfermos han establecido claramente que los pacientes multibacilares y del espectro limítrofe o borderline (BB)-polar lepromatosa son los de mayor importancia epidemiológica en la transmisión.

En cuanto a la forma de transmisión, las lesiones cutáneas y la mucosa nasal han sido reconocidas como fuentes de *M. leprae*. La vía respiratoria alta es la fuente más importante, el microorganismo puede proceder también de la superficie cutánea, sobre todo cuando existe una solución de continuidad. Se han hallado bacilos en productos de excreción tales como: esperma, orina, leche materna y materia fecal; pero no se ha determinado si juegan un rol importante en la difusión de la enfermedad. Se considera la piel y el aparato respiratorio como la vía tradicional de entrada, llama la atención que en los países tropicales que cubren poco su cuerpo, las primeras lesiones aparecen en las áreas descubiertas. El bacilo penetra la piel estando intacta o lesionada, lo cual facilitaría la infección (Aranzazu, 1994; Zulueta, 1994).

El estudio de los factores de riesgo en lepra aportaría importante información epidemiológica para conocer aspectos sobre la diseminación de la enfermedad y permitiría la detección precoz de los nuevos casos o delimitaría los grupos de alto riesgo que será necesario tratar (modificación de factores). La presencia de diferentes eventos en salud, sean negativos o positivos, no ocurren al azar. A través de

los siglos se ha observado una relación muy estrecha de estos eventos con el medio ambiente, las condiciones sociales y otros determinantes. Todos ellos tienen características comunes; su aparición en estrecha relación con su entorno espacial, en un tiempo determinado y en una población específica. En Venezuela, al igual que en otros países de América, la lepra continúa siendo un problema de salud pública.

Según criterios de la OMS, Venezuela alcanzó en 1997 el nivel de eliminación de la lepra, o sea un nivel de prevalencia inferior a 1x10.000 habitantes, con la salvedad que esa tasa de eliminación fue alcanzada como país, pero al evaluar la tasa por estados se observó que varios estados tienen tasas por encima de ese nivel; tal es el caso de los estados; Apure, Barinas, Cojedes y Portuguesa.

Entre las herramientas con las cuales se cuenta, que permiten describir la magnitud de los problemas de salud, para la identificación de sus relaciones con factores condicionantes específicos y para el apoyo a la toma de decisiones sobre intervenciones apropiadas del sector salud, se cuenta con el Sistema de Información Geográfica, el cual consiste en herramientas computarizadas que permiten el manejo, proceso y análisis dinámico de información (incluyendo el de variables múltiples en forma simultánea) ya que permite integrar grandes cantidades de datos de diversas fuentes en mapas, gráficos y cuadros. En vista de la necesidad de precisar la existencia en la población, de factores que al actuar de manera conjunta, pudiesen agruparse como factores de riesgo para contraer la enfermedad y contando con la presencia de varios focos hiperendémicos de lepra; se realizó un estudio de casos y controles en comunidades de los estados Cojedes, Portuguesa y Apure, seleccionadas por su alta prevalencia de lepra, según los datos aportados por los Servicios de Dermatología Sanitaria de cada estado.

## METODOLOGIA

### Tipo de estudio

El presente estudio se inscribe según el análisis y alcance de los resultados dentro de los estudios

explicativos o analíticos y correlacionales, y dentro de la clasificación de los explicativos es un estudio de casos y controles.

Explicativos porque más allá de la descripción de conceptos o fenómenos y del establecimiento de relaciones entre conceptos, está dirigido a responder a la causa de los eventos, explicar porque ocurre el fenómeno (enfermedad de Hansen) y en qué condiciones se expresa.

Siendo la investigación explicativa más estructurada, de hecho implica (exploración, descripción y correlación o asociación).

También es cualitativa correlacional debido a que se trata de tener un alcance correlacional entre dos o más conceptos, categorías o variables, aunque no midiendo la relación, ni estableciendo numéricamente su magnitud.

### Población y muestra

En vista de la necesidad de precisar la existencia en la población, de factores que actuando de manera conjunta, pudiesen agruparse como factores de riesgo para contraer la enfermedad y contando con la presencia de varios focos hiperendémicos de lepra, lo cual ofrece una oportunidad importante para estudiar esta interrelación de factores de riesgo en poblaciones relativamente limitadas, pero con alta transmisión de la enfermedad, se realizó un estudio de casos y controles en comunidades de los Estados Cojedes, Portuguesa y Apure, específicamente en las poblaciones de Mamaria y Ospino del Estado Portuguesa, Mapurite, Retajao, Sta. Teresa, Caño Hondo poblaciones del Estado Cojedes y del Estado Apure la población de Arichuna, todas ellas con altas prevalencia de lepra (hiperendémicos)

### Métodos estadísticos

Para la selección del tamaño de la muestra se utilizó el Epiinfo versión 2010 para lo cual se aceptaría un error alfa de 0,05- un error beta de 0,2, una razón de discrepancia (RD) de 2 y un porcentaje del factor con menor frecuencia en el grupo control de 20%, lo cual significa en un estudio 1 caso a 3 controles; una muestra mínima de 120 casos y 360 controles, pero en

vista de que se dispuso del recurso se estudiaron 252 casos y 1153 controles.

Se calculó la proporción de cada variable en los casos y la proporción en los controles, se estimó la significancia por Chi cuadrado o Fisher y las razones de discrepancia por el método Corn field con sus límites de confianza.

A las variables que resultaron significativas con el análisis univariado se les realizó el modelo matemático de regresión logística, permitiendo representar una variable asociada a un fenómeno, así como predecir las probabilidades de ocurrencia del fenómeno a analizar. En este caso si la variable actuaba como factor de riesgo o como factor protector. Las variables cualitativas se introdujeron como variables “dummy”, convirtiéndolas en valores 0 y 1 de acuerdo a la ausencia o presencia.

#### **Técnicas e instrumentos utilizados:**

El proyecto fue considerado y aprobado por el Comité de Bioética del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina.

Para obtener el consentimiento informado de los participantes, se diseñó un modelo escrito que diera información acerca del estudio, explicando en lenguaje sencillo los procedimientos a seguir, que la participación es voluntaria y la estricta confidencialidad de los datos obtenidos, con el fin de personalizar el proceso de comunicación y se detallaran los pormenores del proyecto.

Se trabajó con la visión de la complementariedad de técnicas e instrumentos debido a la naturaleza del estudio.

Se aplicó una entrevista estructurada, es decir se tomó la forma de un interrogatorio en el cual las preguntas se planteaban siempre en el mismo orden y con los mismos términos, se realizó sobre la base de un formulario previamente preparado y estrictamente normalizado., sustentado por una observación directa al participante en todo el proceso investigativo.

Se recopiló información sobre la condición socio-económica de las familias, servicios con que cuenta la vivienda (luz, aseo, disposición de excretas, teléfono, agua potable), se observaron las características de las viviendas y sus condiciones, además utilizándose el

método de la observación directa, estructurada, ya que de antemano se estableció una pauta de observación explícita en donde se detalló cuales datos se iban a solicitar. La valoración nutricional se determinó en el interrogatorio mediante preguntas que precisaban en que se basaba la alimentación de las personas entrevistadas, dichas preguntas se redactaron para obtener respuestas únicas que permitieran determinar el consumo o no de ciertos alimentos, el horario y la frecuencia de dichos consumos. Lo cual puso de manifiesto si se cumplía con una alimentación balanceada, (encuestas carencias específicas proteico-calórica).

#### **Cicatrices de BCG**

Se revisó número de cicatrices de BCG y relación familiar con pacientes diagnosticados (extra domiciliarios e intra domiciliarios).

Conociendo que el hacinamiento es la acumulación de muchas personas en un espacio reducido, se preguntó a los entrevistados: Número de personas que convivían en esa vivienda, número de habitaciones de la vivienda discriminando como habitación donde dormían las personas.

Previo a la aplicación del instrumento se realizó un proceso de inducción a los entrevistadores con la validación del mismo.

Se realizó evaluación clínica a todos los individuos que conformaron la muestra, realizando una historia clínica dermatológica, las cuales se encuentran archivadas en el Servicio de Dermatología Sanitaria de los respectivos estados. Durante el examen clínico dermatológico realizado tanto a los casos como a los controles, se precisó la edad y el género de cada participante en el estudio. Se utilizó un Sistema de Información Geográfica (SIG) es decir un sistema computacional que permitiera el almacenamiento y relacionara datos georreferenciados con características de mapas, específicamente mapas temáticos es decir que mostrara en forma pictórica información relacionada con uno o más temas, como fue genero de los pacientes, ubicación georreferenciada de las viviendas, ubicación de los pacientes en las viviendas y forma clínica.

**Criterios de inclusión de casos**

- 1.-Pacientes diagnosticados de Enfermedad de Hansen residentes en las poblaciones de Retajao, Mapurite, Sta. Teresa y El Baúl del Estado Cojedes.
- 2.-Pacientes diagnosticados de Enfermedad de Hansen residentes en la población de Arichuna del Estado Apure, mamaria y Ospino del estado Portuguesa.
- 3.-Acepten contestar el instrumento de trabajo (encuesta).

**Criterios de inclusión de controles**

- 1.- Personas aparentemente sanas que residan en las poblaciones en estudio.
- 2.- Acepten contestar el instrumento de trabajo.

**RESULTADOS**

La evaluación se realizó a un total de 1405 individuos. Teniendo una distribución de 252 casos y 1153 controles. Tal como se observa en la Tabla 1; se encontró una mayor proporción del género masculino (68,65%) en los casos con mayor prevalencia en el grupo etario entre 24-34 años de edad. La comparación de riesgo por género, resulto significativa ( $p < 0.0000001$ ) y una razón de verosimilitud de 2,69 (LC95: 2,00-3,64), lo cual indica que el género masculino tiene un riesgo dos veces mayor que el femenino de contraer la enfermedad.

**Relación entre cicatrices de BCG y aparición de la enfermedad.**

Se realizó una distribución de acuerdo al número de cicatrices de BCG, especificando desde cero (0) hasta seis (6) cicatrices de vacunación con BCG. Se obtuvo en los 252 casos que el 45,63% no tenía cicatriz de BCG. En la Tabla 2 se puede observar que el número de casos con cicatrices va disminuyendo hasta 0,39% (1 caso) con 6 cicatrices. Con relación a los controles, el 17% no tenía cicatrices de BCG y solo el 0,17 % con 6 cicatrices de BCG.

**Tabla 1. Distribución de casos y controles de Lepra según el grupo etario y género; provenientes de las comunidades seleccionadas en los estados Cojedes, Apure y Portuguesa**

EDAD SEXO	CA		CO		TOTAL	
	F	M	F	M	CAS	CON
0-14	16	13	04	02	29	06
15-24	11	25	62	55	36	117
24-34	13	35	152	123	48	275
35-44	11	23	182	110	34	292
45-54	12	29	110	114	41	224
55-64	07	15	71	48	22	119
65 Y MAS	09	29	47	58	38	105
SD	0	04	08	07	04	15
TOTAL	79	173	363	517	252	1153

CA: CASOS  
CO: CONTROLES

Al comparar la razón de la discrepancia de los distintos números de cicatrices; considerando riesgo o razón de oportunidad (OR) =1, relacionado a la ausencia de cicatrices; se obtuvieron razones de discrepancia significantes para una cicatriz OR de 3,51 con límites de confianza entre 2,56-4,82. La mayor razón de discrepancia se obtuvo para tres cicatrices con un OR de 17,0 y límite de confianza entre 3,98-102,4.

**Análisis multivariado de las condiciones socioeconómicas**

En el análisis multivariado resultaron positivas las variables tales como: edad, género, hacinamiento, electricidad, familiares con lepra y cicatrices de BCG entre otros. En la Tabla 3 se pueden observar los valores de Beta (razón de discrepancia) y los límites de confianza (LC95) Los valores de Beta, representan el riesgo relativo de cada variable una vez realizado el estudio de multivariados; lo que indica que los factores que indican mayor riesgo, serian familiares con Lepra, contacto con casos no familiares y la falta de ingesta de proteínas. Entre posibles factores de protección podrían indicarse; las condiciones de la vivienda, vacunas de BCG y no vivir en hacinamiento.

**Tabla 2. Distribución de casos y controles de lepra en comunidades hiperendémicas y riesgo relativo según el número de cicatrices de BCG, en los Estados Apure, Cojedes y Portuguesa. Venezuela 2003.**

CICATRIZ DE BCG	CA		CO		TOTAL		OR	LC	
	M	F	M	F	CA	CO			
0	87	28	131	72	115	203	1		
1	67	42	299	377	109	676	3,51	2,56	4,82
2	17	7	65	134	24	198	4,70	2,83	7,83
3	1	1	17	43	2	60	17,0	3,98	102,4
4	0	0	3	10	0	13	7,36	0,99	152,7
5	0	1	2	0	1	2	1,13	0,08	31,90
6	0	1	0	0	1	0	INDE		

CA: CASOS CO: CONTROLES INDE: INDEFINIDOS

### Georreferenciación de los casos de lepra en una comunidad

Utilizando el SIG, se logró describir espacialmente la situación de la lepra en la comunidad. Se tomó una comunidad representativa; en la distribución de los casos con relación al tipo de vivienda, los resultados indican que tanto el número de casos paucibacilares como multibacilares, en vivienda rural supera en 350% el número de casos ubicados en las viviendas tipo rancho, lo cual indica que el tipo de vivienda no es el factor determinante en la aparición de la lepra. (Fig 1). Se puede observar en el mapa; que en varias viviendas se encontró más de un caso de lepra.

## DISCUSIÓN

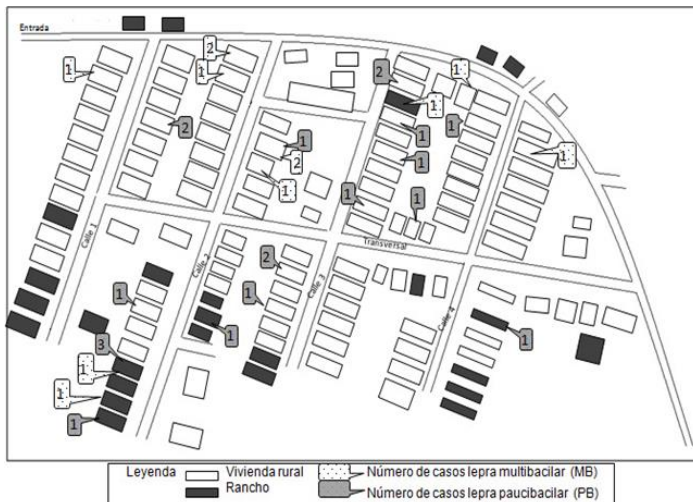
De la serie de factores evaluados en este estudio de casos y controles resultaron significantes en la regresión logística (análisis multivariado) las siguientes variables:

La edad es uno de estos hallazgos, la presencia en el estudio de una proporción relativa de casos de población joven, entonces siendo el periodo de incubación de la lepra hasta de 20 años (Bakker *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2002) esto sugiere, que la enfermedad se está adquiriendo a temprana edad. Se

**Tabla 3. Análisis de las distintas variables que pudieran estar o no, asociadas a la aparición de la Lepra. BETA es la razón de discrepancia, que permite sugerir cuales variables tienen relevancia en la aparición de la enfermedad. El mayor riesgo para contraer la lepra es la convivencia con personas que la padezcan.**

VARIABLE	BETA	p
EDAD	0,501 (0,315 – 0,710)	0,000001
GÉNERO	0,506 (0,327 – 0,728)	0,002
HACINAMIENTO	0,658 (0,441 – 0,983)	0,041
CICATRICES DE BCG FAMILIARES	0,363 (0,246 – 0,549)	0,000002
LEPRA	4,834 (3,131 -7,464)	0,0000001
TELÉFONO	0,433 (0,206 – 0,910)	0,019
ELECTRICIDAD	0,489 (0,311 – 0,768)	0,002
CARNES ROJAS	2,396 (1,594 – 3,601)	0,019
DISPOSICIÓN DE BASURAS	0,461 (0,281-0,758)	0,002
LEPRA EN OTRAS PERSONAS	2,396 (1,594 – 3,601)	0,000029

ha visto en otros países en los cuales la enfermedad se ha eliminado completamente, lo contrario a esta situación, con alta frecuencia relativa en edades avanzadas, es lo que se observa en áreas de baja frecuencia, como fue observado en otros países, entre ellos Portugal. Tal como se plantea en la literatura, que cuando existe un programa estable en lepra, esta aparece con mayor frecuencia en las edades después de los 35 años y comienza a descender en los menores de 15 años, como respuesta al trabajo de control y prevención (Bakker *et al.*, 2006). En este estudio la elevada frecuencia en edades jóvenes se explicaría por la condición de hiper endemicidad de las poblaciones estudiadas.



**Figura 1. Distribución de las viviendas de acuerdo a su tipo y casos de lepra según forma clínica. Caserío Mapurite, Estado Cojedes, Venezuela.**

En relación a género, se encontró un predominio masculino, lo cual está de acuerdo con otros estudios donde se mantienen diferencias, tal como lo encontrado en estudios llevados a cabo en Malawi y Brasil, donde se encontró que la mayor frecuencia correspondía al género masculino (Helene *et al.*, 2002). Aun cuando se ha reportado en algunos países latinoamericanos que no se aprecian diferencias significativas por género. En algunas zonas africanas la mujer está más afectada. El número superior de casos entre los varones ha sido atribuido a su mayor movilidad y oportunidades de contacto con casos en muchas poblaciones.

En este estudio, hubo el predominio del género masculino, siendo mayor el riesgo en este género, la prevalencia de la lepra está cerca de 1,8/1,0 en hombres y mujeres, respectivamente.

Es aceptado que cerca del 90% de la población tiene resistencia natural al bacilo de Hansen, es decir, el individuo se puede infectar pero no se enferma. Esta resistencia natural proviene de la respuesta inmune, de la magnitud y frecuencia de la exposición al bacilo y de la vacunación previa con BCG. Estudios mundiales muy extensos avalados por la Organización Mundial de la Salud durante más de 20 años han

mostrado que la vacuna de BCG protege contra la lepra hasta en un 70% por mecanismos de inmunidad cruzada (Aranzazu *et al.*, 1994).

Con respecto al número de vacunaciones con BCG, en América Latina se han realizado investigaciones acerca de este tema. Un estudio de 90 casos y 3641 controles apareados según edad, sexo y lugar de residencia que se realizó en Venezuela durante la fase de reclutamiento de participantes de un ensayo clínico controlado. (Convit *et al.*, 1992). En otro estudio se estimó que la eficacia de la vacuna de BCG contra la lepra en personas con una o más cicatrices de la vacuna fue 56% y que la protección aumentaba directamente con el número de cicatrices (Setia *et al.*, 2006).

Otra investigación realizada en Brasil con escolares (62 casos y 186 controles) en el cual se observó que la presencia de cicatriz de la vacuna con BCG se asoció directamente con el padecimiento de la enfermedad. El riesgo estimado de contraer la infección de los no vacunados fue 5,3 veces más alto que el de los vacunados. La eficacia estimada de la vacuna fue 81%. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos, considerando que el efecto protector del BCG contra la lepra se encuentra entre 45 y 75% y la protección se incrementa con el número de vacunaciones con BCG (Bakker *et al.*, 2006; Aranzazu *et al.*, 1994; Setia *et al.*, 2006).

El contacto cercano (domiciliario) es otra de las variables que resultó significativa, hay numerosas pruebas de que los contactos domésticos de pacientes leproso corren un gran riesgo de contraer la enfermedad. Un amplio estudio de la población en Filipinas fue el primero que proporcionó índices de estudios normalizados, indicando que los índices de aparición de la enfermedad entre los contactos varían según el número de casos a quienes está expuesto.

Los resultados de este estudio concuerdan con que el contacto intra domiciliario es un factor de riesgo que aumenta la posibilidad de contraer la enfermedad cuatro (04) veces más (Bakker *et al.*, 2006).

También se menciona que el riesgo elevado de contraer la enfermedad se debe al contacto, al medio común y probablemente a una susceptibilidad

heredada. (Ulrich, 1994; Ulrich, 1997) La susceptibilidad parece estar genéticamente determinada. Los diferentes tipos de lepra que desarrolla el individuo están relacionados con los genes ligados al sistema HLA. La lepra no es hereditaria, lo que se puede heredar es la susceptibilidad a padecerla. (Setia *et al.*, 2006).

En cuanto a la desnutrición como factor no específico (Giusti *et al.*, 2007), ha sido señalada no solo en la lepra sino en diversas infecciones, al influir en la respuesta inmune. Aunque no hay evidencia suficiente para probar que la malnutrición es un factor de riesgo en lepra, existen observaciones que permiten precisar que la asociación entre inmunodeficiencia y mal nutrición proteico calórico severa, incrementaría el riesgo de desarrollar la enfermedad y la severidad de la infección. En este estudio la disminución en la ingesta de proteínas, puesta de manifiesto en la disminución del consumo de carnes rojas fue significativo como factor de riesgo, es más, todas las variables que se relacionaban con alimentación resultaron significativas (ingesta de harinas, consumo de carnes blancas, etc.).

Es sabido que a menudo la lepra acompaña las malas condiciones de vida. En Venezuela se ha intentado apreciar la influencia del nivel de desarrollo socioeconómico en la endemia de lepra, ponderando un conjunto de indicadores que incluyen: estado nutricional, alfabetización, saneamiento básico, disponibilidad de servicios médicos, grado de industrialización, lo cual permitió visualizar importantes diferencias en cuanto a la incidencia y prevalencia asociadas al grado de desarrollo socioeconómico. Igualmente se ha apreciado que la prevalencia de lepra es seis veces más alta en los países de bajo nivel económico (Pinto *et al.*, 2002).

El hacinamiento es la acumulación de muchas personas en un espacio reducido utilizado como vivienda y traduce las condiciones de pobreza en las cuales viven o han vivido capas de la población (OPS-OMS, 2000). Los criterios para establecer la situación de hacinamiento varían según los diferentes países y se encuentra entre 2 y 4 personas por pieza o 6 o más personas por dos piezas (Setia *et al.*, 2006; OPS-OMS,

2000). Desde la concepción de que el espacio es el elemento básico de la vivienda para la defensa de la personalidad y de los factores relacionados con las enfermedades, por supuesto incluyendo la lepra (Helene *et al.*, 2002) y las formas clínicas bacilíferas que permiten el mayor acercamiento de pacientes con contactos intra domiciliarios y aumenta el riesgo de contraer la enfermedad (Zuñiga *et al.*, 1987; Convit, 1980). Fue observado en las poblaciones estudiadas que algunas viviendas, especialmente de los casos, están sobre habitadas y sus habitantes viven en hacinamiento.

La privación material evaluada mediante el ingreso o el consumo del individuo o la familia o aún más la falta de ingreso necesaria para satisfacer las necesidades, es un coadyuvante para los otros factores de riesgo en la lepra como son la falta de una vivienda adecuada y que tenga los servicios básicos necesarios. Un estudio publicado por el Patronato de Rehabilitación Social del Enfermo de Lepra en Madrid, España, plantea que esta enfermedad es más frecuente en pacientes analfabetos y sin ocupación o con ocupaciones mal remuneradas (Ministerio de Servicio Sociales, 1992). Coincidiendo con los trabajos realizados por Pinto Neto (Pinto *et al.*, 2002), al afirmar que la lepra se ve en personas con poco desenvolvimiento económico. Los factores que resultaron significantes en el análisis univariado, pero no en el multivariado pueden ser considerados como de asociación secundaria, como fueron pisos, tipo de vivienda, agua, conuco, consumo de vegetales, y carnes blancas, son factores relacionados a las condiciones de vida, las cuales fueron mejor representadas en este estudio por otros factores evaluados.

En relación a trabajo remunerado, posiblemente el hecho de ser poblaciones rurales con escasas fuentes de trabajo, sean la explicación a la falta de diferencia significativa, ya que existe la posibilidad que las personas sanas emigrarían selectivamente hacia áreas con más facilidades de obtener trabajo.

## REFERENCIAS

- ARANZAZU N. (1994). "Enfermedad de Hansen. Etiología, clínica y clasificación". *Dermatología Venezolana* 32:145-152.
- ARANZAZU N., PÉREZ, F. (1994). "Inmunoterapia en lepra". *Dermatología Venezolana* 32:177-179.
- AVILAN R., DIAZ D., ULRICH M., QUIROGA R., et al. (1999). "Control de la lepra después de más de cinco décadas de desarrollo". *Revista de Leprología XXII*:145-162.
- BAKKER M.I., HATTA M., KWENANG A., VAN MOSSEVELD, FABER W.R., KLATSER P.R., et al. (2006). "Risk factors for developing leprosy: a population-based cohort study in Indonesia". *Lepr Rev* 77:48-61.
- CUEVAS L, DE LA HOZ F, LEON C, GUERRERO M, et al. (2004). "Caracterización clínica y Sociodemográfica de casos nuevos de lepra en municipios endémicos de Colombia". *Rev Salud Publica* 6(1):50-63.
- CONVIT J. (1980). "Bases conceptuales de la vacuna contra la lepra". *Dermatología Venezolana XVIII*:103-107.
- CONVIT J., ARANZAZU N., ZUÑIGA M., et al. (1983). "Immunotherapy and immunoprophylaxis of leprosy". *Lepr Rev SI*:47-60.
- CONVIT J. (1980). "Bases conceptuales de la vacuna contra la lepra". *Dermatología Venezolana XVIII*:103-107.
- GIUSTI T.C., NOYA ALARCON O.G. (2007). "Enfermedades Desatendidas: Una oportunidad para promover la salud y el desarrollo". *Rev Soc Med Quir. Hosp Emerg Perez de Leon* 1:50-51
- HELENE L.M.F., SALUM M.J.L. (2002). "A reprodução social da hanseníase: um estudo do perfil de doentes com hanseníase no município de São Paulo". *Cad Saude Publica* 18(1):101-13.
- OPS-OMS. (2000). "Boletín Eliminación de la lepra de las Américas". Noviembre 2008. N°8.
- OPS. (2002). "Sistemas de Información Geográfica en Salud, Conceptos Básicos". Washington, D.C. 92p.
- PINTO NETO JM, et al. (2002). "Considerações epidemiológicas referentes ao controle dos comunicantes dos hanseníase". *Hansen Int* 27(1):23-28.
- MINISTERIO DE SERVICIOS SOCIALES. (1992). "Patronato de Rehabilitación Social del enfermo de lepra. Análisis de la realidad social del enfermo de lepra". *Eurocolor* :31-63.
- NAAFS B., SILVA E., VILANI-MORENO F., ELAINE C.M., et al. (2001). "Factors influencing the development of leprosy an overview". *International Journal of Leprosy* 69:12001.
- TERRONES A. (1987). "Lepra en la América: sus antecedentes históricos y perspectivas". *CEPIALET* 1987:1-8
- ULRICH M. (1994). "Inmunología de la lepra". *Dermatología Venezolana* 32:167-170.
- ULRICH M. (1997). "The Immunology of leprosy". *Med Cutan Iber Lat Am XXV*:177-192.
- ZUÑIGA M. (1981). "Avances recientes en la epidemiología de la lepra". *Boletín Dermatológico Sanitario* 18:1-2.
- ZULUETA A. (1994). "La Lepra; evolución histórica, epidemiología y medidas de control". *Dermatología Venezolana* 32:181-190.

# Avances sobre una vacuna para la Enfermedad de Hansen

**Nazareth Durán Rondón<sup>1</sup>**

ndr493@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8237-6669>

**Elsa Rada<sup>1</sup>**

elsa.rada@gmail.com

**Oscar Reyes-Jaimes<sup>1</sup>**

oreyesjaimes@yahoo.com

**Lucibel Crespo<sup>1</sup>**

lucibelcrespo@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit",  
Facultad de Medicina, Universidad  
Central de Venezuela - Ministerio del Poder  
Popular para la Salud.

## RESUMEN

La lepra es una enfermedad infecciosa cuyo tratamiento consiste en el esquema de poliquimioterapia (rifampicina, dapsona y clofazimina) que ha logrado disminuir su prevalencia mundial. A pesar del impacto positivo de esta terapia, su eficacia se encuentra en riesgo con la aparición de resistencia a los medicamentos. Estas preocupaciones han sugerido el desarrollo de una vacuna capaz de promover una respuesta inmune de larga duración para la eliminación de la lepra. El objetivo de este trabajo es realizar una revisión documental de los aspectos históricos de la inmunoterapia e inmunoprofilaxis en Venezuela y a nivel mundial, mencionando los avances en proteómica y genómica, las vacunas iniciales y las actualmente operativas en la enfermedad.

**Palabras Clave:** Enfermedad de Hansen; *Mycobacterium leprae*; Vacuna; Inmunoterapia; Lep-VaxF1.

## ADVANCES ON A VACCINE FOR HANSEN'S DISEASE

### ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease whose treatment consists of the polychemotherapy scheme (rifampin, dapsone and clofazimine) that has managed to decrease its worldwide prevalence. Despite the positive impact of this therapy, its efficacy is at risk with the appearance of resistance to the drugs. These concerns have suggested the development of a vaccine capable of promoting a long-lasting immune response to the elimination of leprosy. The objective of this work is to carry out a documentary review of the historical aspects of immunotherapy and immunoprophylaxis in Venezuela and worldwide, mentioning the advances in proteomics and genomics, the initial vaccines and those currently operative in the disease.

**Keywords:** Hansen's disease; *Mycobacterium leprae*; vaccine; Immunotherapy; Lep-VaxF1.

## INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infecciosa milenaria que genera un estigma en los pacientes que la padecen, debido a que causa afectación de la piel y nervios periféricos produciendo neuropatías y el desarrollo de discapacidades. En el año 1873, el *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) se identificó como agente etiológico causante de la enfermedad por el médico Gerhard Hansen (Zulueta *et al.*, 1994). El tratamiento de elección por la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO) desde 1982 ha sido el esquema de poliquimioterapia supervisada (PQT) (combinación de rifampicina, clofazimina y dapsona) y es suministrado de manera gratuita (WHO, 2010). La eliminación de la lepra como problema de salud pública (prevalencia inferior a 1 por 10.000 habitantes) se logró en Venezuela gracias a la detección temprana de casos y al tratamiento PQT. Sin embargo en nuestro país actualmente persisten zonas hiperendémicas a nivel subregional. En el año 2016 se notificaron más de 200.000 casos a nivel mundial, entre ellos 12.819 nuevos casos con deformidades visibles clasificadas como discapacidad de grado 2. La incidencia de nuevos casos está disminuyendo a un ritmo de aproximadamente un 3% al año (WHO, 2018). A pesar del impacto positivo que ha tenido la PQT sobre la prevalencia mundial de la lepra, con disminución de la transmisión de la enfermedad, esta enfermedad se mantiene cada año como lo demuestran los nuevos casos que aún se detectan en el mundo (Duthie *et al.*, 2011; WHO, 2019). La eficacia PQT también desaparecerá con la aparición de resistencia a los medicamentos (Ji *et al.*, 1997; Matsuoka *et al.*, 2000; Cambau *et al.*, 2018). Si bien la PQT sigue siendo efectiva en la mayoría de los casos, pueden ocurrir recaídas o reinfecciones. Aunque las tasas de reincidencia son generalmente bajas (~1%), en algunas zonas endémicas de lepra las tasas de recaída son inaceptablemente altas (Gelber *et al.*, 2004; WHO, 2010). Investigadores han reportado cepas de *M. leprae* resistentes a la PQT (You *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2004). Los datos actuales proporcionados por el sistema de vigilancia para evaluar la fármacorresistencia de la lepra (liderado por la OMS en 18 países endémicos)

han revelado que en el periodo 2009-2015 el 6,8% de las cepas de *M. leprae* tienen mutaciones relacionadas con la resistencia a los antibióticos de primera y segunda línea (Cambau *et al.*, 2018). La aparición de la lepra resistente a los medicamentos podría tener consecuencias catastróficas, deshaciendo los esfuerzos de la campaña de la OMS y provocando un rebote de incidencia de la lepra. Estas preocupaciones, junto con las limitaciones actuales en las estrategias de control y tratamiento, sugieren el desarrollo de herramientas adicionales tales como el diseño de una vacuna capaz de promover una respuesta inmune de larga duración para la eliminación de la lepra (Duthie *et al.*, 2011). El objetivo de esta revisión se centra en describir los aspectos históricos de la inmunoterapia e inmunoprofilaxis en Venezuela y a nivel mundial, mencionando los avances en proteómica y genómica, las vacunas iniciales y las actualmente operativas en la enfermedad.

### **Necesidad de una vacuna en lepra**

En Venezuela, el programa de control de la lepra se desarrolla desde el año 1946 (Zulueta *et al.*, 1994). Hasta la actualidad, el diagnóstico precoz y el tratamiento con PQT siguen siendo el pilar principal para poder disminuir la carga bacteriana de esta enfermedad. Se estima que existe un retardo diagnóstico desde el momento del contagio, hasta la presencia del primer signo clínico perceptible de 1-3 años en más del 50% de los pacientes (De Rojas *et al.*, 1994). Tales retrasos pueden tener un impacto negativo sobre el deterioro de la función nerviosa y la respuesta al tratamiento (Van Veen *et al.*, 2006), surgiendo la necesidad de una vacuna eficaz con potencial tanto para uso profiláctico como terapéutico. Una vacuna a diferencia del tratamiento de drogas, podría ser utilizada para proporcionar una protección activa y sostenida tanto en individuos infectados como en no infectados.

La vacuna es una preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos protectores. Dependiendo de su conformación se pueden dividir en dos categorías principales: vacunas vivas (utiliza organismos

atenuados en vivo), y no vivas (agentes patógenos enteros muertos o componentes de ellos, o subunidades) (Capecchi *et al.*, 2004). La inmunoterapia, permite estimular el sistema inmunitario frente a una patología. Las vacunas tienen utilidad profiláctica y/o terapéutica. La OMS ha implementado en la terapéutica contra la lepra inmunizar a los individuos con Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) (WHO, 2019). La presencia de una cicatriz de BCG ha sido reconocida como un factor protector para la lepra (Goulart *et al.*, 2008). El impacto de la vacunación con BCG en la lepra a menudo se pasa por alto, ya que las campañas de vacunación generalizadas han coincidido con la campaña de la OMS-PQT (WHO, 2018). El grado de protección contra la lepra que ofrece la vacuna BCG, ha variado dramáticamente entre los estudios, es más alta en los individuos más jóvenes y disminuye con el tiempo. Los metaanálisis sistemáticos indican una eficacia protectora general de 26 a 41% en estudios experimentales frente a 61% en estudios observacionales (Merle *et al.*, 2010). Debido a su utilidad terapéutica para potenciar la respuesta inmune, y conociendo el defecto inmunológico en los pacientes lepromatosos, Convit *et al.* desarrollaron una vacuna con capacidad de estimular el sistema inmunológico formada por la combinación de *M. leprae* muerta por calor y BCG, la cual ya había demostrado cierto grado de protección contra la enfermedad (Convit *et al.*, 1982; Aranzazu *et al.*, 1984; Aranzazu *et al.*, 1994).

## **Fundamentos de la inmunoterapia en Hansen utilizada en Venezuela**

### **Primeros descubrimientos en lepra**

Después del descubrimiento del bacilo de Hansen, los leprólogos empezaron a hacerse una serie de preguntas en relación con la patogenia de la enfermedad; ¿por qué razón solo algunos sujetos desarrollan la enfermedad? ¿por qué unos pacientes desarrollan una forma benigna y otros una maligna? De manera de dilucidar estas interrogantes incomprensibles para el momento, el profesor Mitsuda Kensuke, científico japonés elaboró en 1916 una suspensión de bacilos obtenidos

de lepromas humanos, esterilizados a altas temperaturas, al cual se le adicionó ácido fénico. El filtrado de esta suspensión se llamó lepromina (Mitsuda, 1916). A numerosos pacientes con lepra y a sujetos sanos se les inyectaba 0,1 mL de lepromina por vía intradérmica en la cara anterior del antebrazo o del muslo. A los 20 o 30 días se examinaba la respuesta a la prueba y se encontraron los siguientes resultados: un primer grupo (1) de pacientes presentó una reacción Mitsuda negativa, sin ninguna reacción de eritema o de edema en el sitio inyectado, la respuesta era muy débil; el segundo grupo (2) daba una reacción ligeramente positiva, con reacción eritematosa, edematosa entre 10 mm - 15 mm y el tercer grupo (3) dio resultados fuertemente positivos mayores de 15 mm. Los pacientes del grupo 1 (el 20 a 30%) mostraban que tenían una reacción de defensa muy deficiente hacia el bacilo de Hansen, desarrollando formas más severas de la enfermedad, con gran número de bacilos (multibacilares), compromiso no solo de la piel, sino también de algunas vísceras. Los pacientes de los grupos 2 y 3 (el 70 a 80%) mostraban mejores defensas contra la enfermedad; presentaban menor número de bacilos (paucibacilares) y la evolución de la enfermedad de carácter más benigna. Las diferentes formas clínicas de la lepra son el resultado de la interacción huésped-parásito y están dadas por la presencia o ausencia de la respuesta celular ante el *M. leprae*. En Venezuela, como en otras partes del mundo, se ha demostrado que sólo un pequeño porcentaje de la población general es incapaz de reconocer específicamente al *M. leprae*. De este grupo se derivarían las formas difusas de la enfermedad, es decir la lepra lepromatosa y la borderline lepromatosa. El defecto específico reside en los mecanismos de defensa inmunológica y afecta tanto al macrófago como al linfocito T. El resto de la población, entre el 80 al 85% si es capaz de desencadenar los fenómenos de respuesta celular al entrar en contacto con el *M. leprae*. Este gran grupo es competente para eliminar totalmente el bacilo, permaneciendo sin evidencias clínicas de la enfermedad o puede dar formas benignas, limitadas; que corresponden al polo tuberculoide (Aranzazu *et al.*, 1984). La demostración de un defecto inmunológico en las formas de lepra de baja resistencia (LL-BL-LI

Mitsuda negativo), proporciona una base teórica firme para los ensayos de inmunoterapia en el tratamiento de esta enfermedad (Aranzazu *et al.*, 1994).

## **Desarrollo de una vacuna contra la lepra en Venezuela**

En 1969 Convit, Ávila y Goihman realizaron pruebas en pacientes con Hansen utilizando la tinción del azul de metileno. En dicho estudio se evidenciaba una coloración azul en las áreas afectadas de lepra lepromatosa luego de la inyección intravenosa del colorante, demostrando que los lípidos de membrana de la capa lipídica del *M. leprae* formaban complejos con el azul de metileno (Ávila *et al.*, 1970). En consecuencia, buscaron áreas de piel sana en pacientes con lepra lepromatosa y tuberculoide, allí se inoculó *M. leprae*. Posteriormente se inyectó azul de metileno y se observó si el sitio de inoculación se teñía de azul (Goihman *et al.*, 1972). Para sorpresa del grupo se encontró que las micobacterias en el paciente con lepra lepromatosa, LL permanecieron intactas, y en los pacientes con lepra tuberculoide, LT eran destruidas al cabo de 21 días (Ávila, 1996). Posteriormente en 1972, el mismo grupo de investigadores, al cual se incorpora María Eugenia Pinardi, desarrolló una prueba cutánea que permitió observar la incapacidad de la célula macrófaga frente al *M. leprae*, comparándola con la respuesta que dicha célula tiene frente a otras bacterias (Convit *et al.*, 1972). En 1974 Convit *et al.* en un segundo enfoque se preguntaron cuál sería el comportamiento del macrófago hacia el *M. leprae* de una persona susceptible o de un enfermo lepromatoso, aplicando simultáneamente una mezcla de *M. leprae* más otra micobacteria (BCG) (Hanks *et al.*, 1956). Se encontró que el macrófago activado por la segunda bacteria de la mezcla logró destruir y eliminar tanto al *M. leprae* como el BCG. Estos resultados sugieren que la mezcla de micobacterias provocaría la digestión del *M. leprae* y la liberación de alguno de sus antígenos, los cuales estimularían los linfocitos del sistema inmune en personas incapaces de realizar esta digestión (Ávila, 1996).

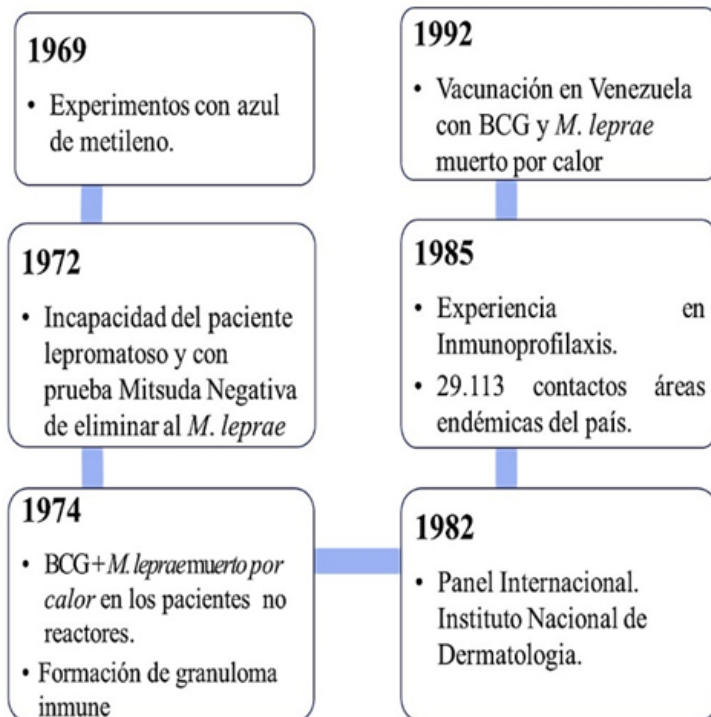
Posteriormente, una vez establecido el modelo que llevaba a la destrucción del *M. leprae* por personas susceptibles a la lepra, Convit *et al.*, 1979-1983 realizaron nuevos estudios e intentaron determinar si

los hallazgos antes mencionados tenían una influencia en grandes grupos de población, tanto en enfermos lepromatosos como en personas sanas susceptibles (contactos de pacientes que presentaron respuesta negativa a la lepromina). Esta etapa duró 10 años y mostró la capacidad de *M. leprae* + BCG para producir cambios inmunológicos en dichas personas con la consiguiente mejoría de su enfermedad (Convit *et al.*, 1979).

Debido a la importancia de los hallazgos histopatológicos para la interpretación de los estudios de inmunoterapia, en diciembre de 1982 se llevó a cabo una experiencia en Caracas que consistió en un panel internacional de 6 histopatólogos expertos en lepra que examinarían a ciegas material histológico de pacientes antes y después de inmunoterapia. El grupo se reunió en el Instituto Nacional de Dermatología (Hoy en día Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit). Las observaciones de dichos expertos se analizaron para establecer los cambios histológicos a diferentes períodos de inmunoterapia. Se observaron cambios en la clasificación hacia el polo tuberculoide del espectro en un 90,5% de los pacientes inicialmente clasificados como lepromatosos y en 83,3% de aquellos inicialmente clasificados como borderline lepromatosos, BL (Convit *et al.*, 1982). Este es uno de los estudios que galvaniza años de investigación del grupo de Convit en el sentido de la efectividad de la vacuna utilizada como inmunoterapia con fines terapéuticos y se decide realizar una experiencia de inmunoprofilaxis (Figura 1).

## **Vacuna *M. leprae* + BCG (vacuna Convit)**

En el Instituto de Biomedicina, el Dr. Jacinto Convit ideó un modelo de vacunación como inmunoterapia de las formas LL-BL-LI Mitsuda negativo, y además en contactos Mitsuda negativo (Inmunoprofilaxis) (Convit *et al.*, 1972). La explicación inmunológica de la vacuna no estaba bien determinada; se podría alegar que en pacientes que no respondían a los antígenos de la lepra, al introducir el BCG como “portador inmunológico” las células T fueron capaces de desarrollar una buena respuesta inmunológica del tipo Th1 (Aranzazu *et al.*, 1994). En cualquier caso, los resultados obtenidos proporcionaron evidencias de que esta vacuna utilizada por Convit tiene actividad



**Figura 1.** Inicios de la inmunoterapia y posterior inmunoprolifaxis en Venezuela.

terapéutica en pacientes anérgicos y que debería tener potencial inmunoprolifático en la población de contactos en regiones endémicas (Convit *et al.*, 1972; Aranzazu *et al.*, 1994). La vacuna utilizada estaba constituida por una mezcla de *M. leprae* purificado siguiendo el método de Draper, autoclavado a 121°C, durante 15 minutos, y ajustado a una concentración de  $6 \times 10^8$  *M. leprae* por dosis, que se mezclaba con BCG liofilizado, y se administraba por vía intradérmica (Instituto Pasteur Francia). La dosis colocada del preparado variaba de acuerdo a la respuesta obtenida por la prueba tuberculínica (PPD) previamente colocada al paciente utilizando:

- 1.- 0,1-0,2 mgs para los PPD negativos y hasta 10 mm
- 2.- 0,02 mgs para los PPD entre 10-20 mm
- 3.- 0,01 mgs para los PPD de 20 mm o más
- 4.- 0,001 mgs para los PPD de 40 mm o más (Aranzazu *et al.* 1994)

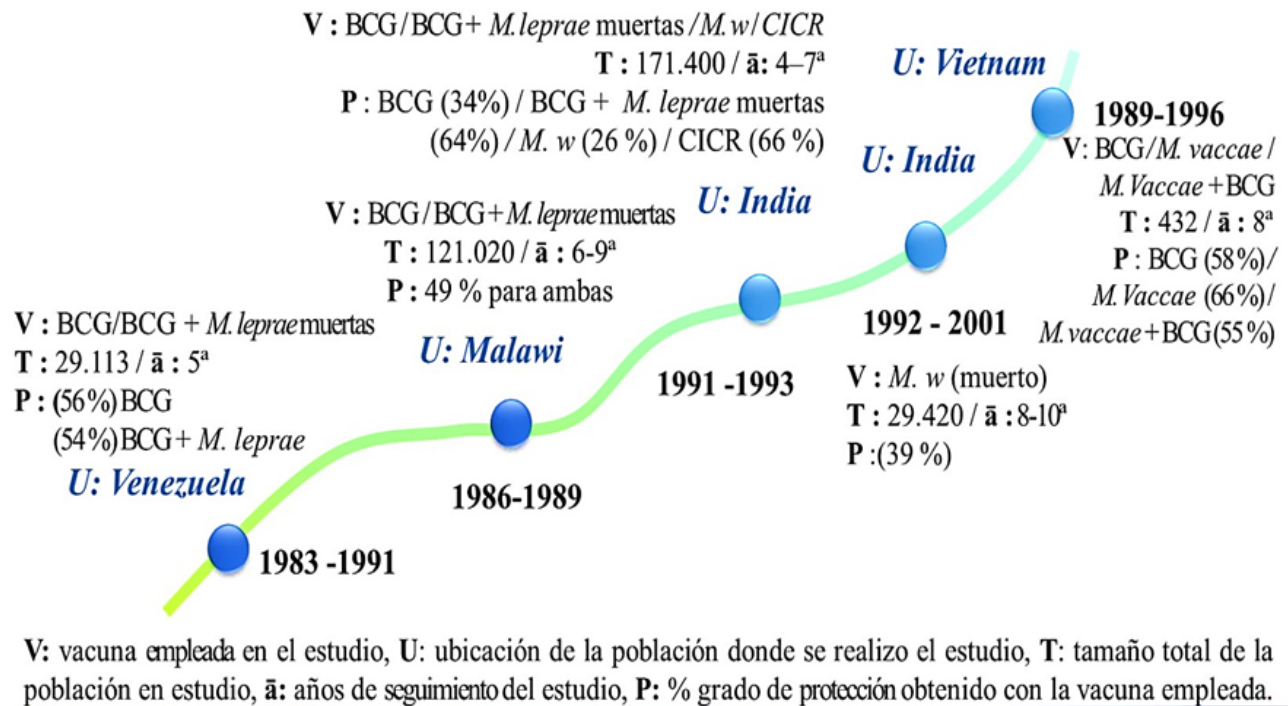
El número de dosis de inmunoterapia era por lo general: 10 dosis, intervalo entre las dosis de 12 semanas y se colocaban en un periodo aproximado de 30 meses en total. La vía de administración era intradérmica; 0,5 mL de la mezcla que se distribuían en tres sitios, en regiones deltoideas y parte alta del

dorso. Las respuestas locales de la vacuna eran de la misma intensidad que las observadas en la aplicación de BCG solamente y la cicatriz residual variaba entre 5 y 9 mm (Aranzazu *et al.*, 1994). Los resultados reportados demostraron la eficacia de la mezcla *M. leprae* y BCG en inducir cambios inmunológicos en las formas de lepra de baja resistencia, así como en contactos Mitsuda negativos. Tal como se desprende de las observaciones preliminares los resultados fueron, la remisión de las lesiones en los casos de lepra indeterminada y persistente con positivización a la reacción de Mitsuda (Convit *et al.*, 1976).

### **Primeras exploraciones en la búsqueda de una vacuna en Venezuela y el mundo**

La experiencia con la vacuna diseñada por Convit fue realizada en los estados hiperendémicos de Apure, Táchira y Mérida. En un intento por identificar una vacuna contra la lepra que ofreciera una protección mayor y más consistente que la BCG, se evaluó el potencial de vacunas de *M. leprae* y otras micobacterias en varios ensayos.

Convit y sus colegas entre 1983 - 1991 compararon la eficacia de BCG con y sin *M. leprae* en ensayos sobre 29.113 contactos procedentes de zonas endémicas de lepra en Venezuela (Figura 2); no se encontró evidencia en los primeros 5 años de seguimiento de que el BCG más *M. leprae* ofreciera mejor protección contra la lepra que la aplicación de BCG solo (Convit *et al.*, 1992). Entre 1986 y 1989, el Grupo de Ensayos de Prevención de Karonga (norte de Malawi), evaluó la protección brindada por la vacunación con BCG vs BCG / *M. leprae* muerto por calor. Se encontró que, una dosis de la vacuna BCG ofrece más del 50% de protección contra la lepra. Al igual que en el ensayo venezolano, no se encontró que la vacuna BCG / *M. leprae* mejorara la protección contra la enfermedad (Karonga, 1996). Gupte y col, entre principios de 1991 y 1993, en el sur de la India llevaron a cabo un ensayo similar, con una población de 171.400 voluntarios. Realizaron un ensayo doble ciego, aleatorio y profiláctico utilizando cuatro preparaciones de vacunas potenciales contra la lepra (BCG solo; BCG/*M. leprae* muerta; *Mycobacterium welchii* (*Mw*) y la cepa referente micobacteriana del complejo *M. intracelulare* CICR). En dos encuestas



**Figura 2.** Inmunoterapia e Inmunopprofilaxis en áreas endémicas de lepra.

realizadas en los 8 años posteriores a la inmunización, se determinó que la protección conferida por BCG/*M. leprae* fue de 64%, y CICR de un 65.5% (Gupte *et al.*, 1998). Por lo tanto, a diferencia de los ensayos anteriores en Venezuela y Malawi, el ensayo del sur de la India indicó que la vacuna BCG/*M. leprae*, y también la vacuna del CICR, cumplían los requisitos de los servicios públicos de salud y podrían implementarse para controlar la lepra (Duthie *et al.*, 2011).

En el mundo se comenzaron a realizar los estudios inmunopprofilácticos antes mencionados en países endémicos de lepra incorporando distintas micobacterias (*Mw*, *M. vaccae*) para evaluar la respuesta protectora ante la enfermedad (Truoc *et al.*, 2001) (Figura 2). En todos estos estudios realizados no se evidenció que otra vacuna compuesta por una micobacteria sola, ni mezclada con BCG mejorara la protección otorgada por BCG solo. La estrategia basada en una vacuna con *M. leprae* se limitó por la dificultad asociada con la ampliación de la producción, debido a que *M. leprae* no puede ser cultivado en laboratorio, y por lo tanto era necesario idear una vacuna formada de una subunidad de *M. leprae*. El enfoque convencional para el desarrollo de vacunas basado en el cultivo del microorganismo en

condiciones de laboratorio a partir del cual se aíslan individualmente los componentes del patógeno mediante el uso de métodos bioquímicos, inmunológicos y microbiológicos no es aplicable a microorganismos no cultivables en este caso el *M. leprae*, por ello han surgido nuevas generaciones de vacunas en lepra.

### **Avances obtenidos con el proyecto genoma y proteómica en la formación de vacunas.**

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y microbiología moderna, así como el aumento del conocimiento de la patogénesis de muchas bacterias, se exhibió la primera innovación importante en el campo de las vacunas. Este enfoque dio lugar a la producción de vacunas de subunidades basadas en antígenos protectores específicos. La era genómica ha cambiado por completo la manera de diseñar vacunas, partiendo de antígenos vía simulación computacional "*in silico*". Estas técnicas informáticas son particularmente atractivas, porque son extremadamente rápidas y rentables y se pueden aplicar incluso sin que el compuesto esté físicamente disponible, independientemente de su abundancia y

sin la necesidad de crecer el patógeno *in vitro* (Capecchi *et al.*, 2004). Los métodos "*in silico*" se usan para la predicción y validación de técnicas y estrategias actuales tales como la predicción de los efectos sobre la salud humana. Actualmente es posible determinar la secuencia completa del genoma de un patógeno bacteriano en muy pocos meses y a muy bajo costo. Este nuevo enfoque basado en el análisis de las secuencias del genoma mediante el uso de herramientas bioinformáticas permitió identificar antígenos candidatos al desarrollo de vacunas. Esta técnica se denominó "vacunología inversa" (Rappuoli, 2000; Rana *et al.*, 2016).

Con la disponibilidad de secuencias genómicas, los adelantos logrados en las técnicas y los avances en la separación de proteínas utilizando técnicas bioquímicas de electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-gel) y posteriormente su análisis en espectrometría de masas ahora es posible separar, identificar y catalogar las proteínas expresadas en una célula bajo varias condiciones. Todo el conjunto de proteínas codificadas por el genoma se ha definido como "proteoma" (Grandi, 2001; Washburn *et al.*, 2000). En el análisis del proteoma, se encuentra una mezcla de proteínas tales como preparaciones de membranas externas o lisadas de células enteras y se resuelve primero en sus componentes individuales mediante procedimientos de separación. Una vez separados, cada proteína se somete a digestión con una proteasa específica para generar fragmentos de péptidos discretos y las masas moleculares se pueden evaluar con precisión por espectroscopía de masas. El resultado experimental se compara entonces con los resultados teóricos esperados para la misma degradación específica de todas las proteínas predichas a partir de la secuencia del genoma. De esta manera, la proteína puede ser inequívocamente identificada como el producto de un gen específico. El análisis físico del proteoma permite la identificación de proteínas expresadas en un compartimento particular o bajo diferentes condiciones de crecimiento. El análisis del proteoma del compartimento de la membrana celular es una forma más directa para identificar proteínas de superficies expuestas y por lo tanto candidatas a vacunas

(Capecchi *et al.*, 2004).

La secuencia completa del genoma de la cepa de *M. leprae* se obtuvo a partir del año 2001; reportando en su configuración 3.268,210 pares de bases (Cole *et al.*, 2001). El análisis bioinformático descubrió 1.614 genes que codifican proteínas y otros 50 que codifican ARN estables. Estos comprenden solo el 49.5% del genoma con el resto ocupado por pseudogenes (Singh *et al.*, 2011). Inicialmente se encontraron 1.116 pseudogenes (Cole *et al.*, 2001), pero esto aumentó a 1.293 cuando otras secuencias del genoma estuvieron disponibles para su comparación (Gómez *et al.*, 2007). Existen 165 genes aparentemente funcionales que no tienen ortólogo con *M. tuberculosis*, por lo tanto, son genes que codifican proteínas específicas para *M. leprae*, las cuales ofrecen un potencial como reactivos de inmunodiagnóstico específicos (Katoch *et al.*, 2007; Akama *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011). Con el análisis del *M. leprae* se encontraron una amplia variedad de proteínas secretoras y asociadas a la superficie (PSAS), como las lipoproteínas, las proteínas de membrana externa (PME) y las proteínas secretoras que pueden considerarse como las dianas antigénicas más prometedoras que actuarían como agentes de las vacunas (Rana *et al.*, 2016). Muchas de las PSAS bacterianas liberadas en el entorno del huésped han sido estudiadas y se ha informado que juegan un papel importante en la obtención de vacunas potentes (Li *et al.*, 2015; Rana *et al.*, 2015). Las PME son componentes importantes de la pared celular de las micobacterias, pero hasta ahora apenas se han investigado en el género *Mycobacterium sp* (Mah *et al.*, 2010; Rana *et al.*, 2014). Del proteoma completo de *M. leprae*, se identificaron 17 lipoproteínas, 19 proteínas de membrana externa (PME), 11 Proteínas secretoras (PSAS) (Rana *et al.*, 2016). De las 19 PME, 4 son esenciales para la supervivencia del *M. leprae* por lo que representan las dianas más expuestas que entran en contacto directo con el entorno del huésped. Estas proteínas se identificaron como potenciales para unirse a un amplio rango de alelos MHC I y MHC II. Once de las PME contienen epítopes para células B ejecutando una respuesta humoral por lo que también son candidatas importantes para la elaboración de vacunas. Estos hallazgos de reconocimiento de células B y

células T con estas PME podrían contribuir a la defensa inmune del huésped contra la lepra (Rana *et al.*, 2016).

### Enfoque de la post- genómica en la creación de vacunas

Mediante la secuencia completa del genoma del *M. leprae*, a través de marcos de lectura abierta putativos que solo se encontraron en el genoma de *M. leprae* y carecía de homólogos en cualquiera de las bases de datos bacterianas (myco) disponible en ese momento, se identificaron secuencias de 4 antígenos (hipotéticos). Estos se probaron por su capacidad para inducir respuestas *in vitro* de células T en individuos infectados por *M. leprae* (Figura 3) (Geluk *et al.*, 2011). Entre los antígenos proteicos que han sido capaces de detectar respuestas de anticuerpos en la mayoría de los pacientes se incluyen ML2028 (pertenece al complejo 85B), ML2038 (bacterioferritina), ML2380 (proteína secretada), ML2531 (proteína de potencial virulencia, ESAT6) (Spencer *et al.*, 2011). El Ag85B es una proteína altamente conservada entre las especies de micobacterias probablemente debido a su papel fundamental en la síntesis de la pared celular como

una mycolyl transferasa. ESAT6 es una proteína secretora con virulencia restrictiva principalmente en el *M. tuberculosis* (*Mtb*) y organismos complejos (Figura 3). Ambas proteínas son ampliamente reconocidas por los anticuerpos en los enfermos de lepra multibacilar (Coppola *et al.*, 2018). Puede ser posible diseñar una proteína de fusión que combine epítomos críticos de estas proteínas que son reconocidos por la mayoría de los casos de lepra paucibacilar para facilitar una mejor detección de la enfermedad (Geluk *et al.*, 2011).

### Adyuvantes que potencian una mejor respuesta inmune

Para la elaboración de una vacuna es necesaria la utilización de un adyuvante; compuesto capaz de potenciar una respuesta inmunitaria (Mbow *et al.*, 2010). La inmunidad innata forma la primera línea de defensa del huésped contra la invasión microbiana. Dirigirse a los receptores inmunes innatos con adyuvantes es una estrategia lógica para la terapéutica. Son muchos los tipos de adyuvantes que han sido utilizados en la creación de una vacuna. Se describe como adyuvante ideal, aquel compuesto

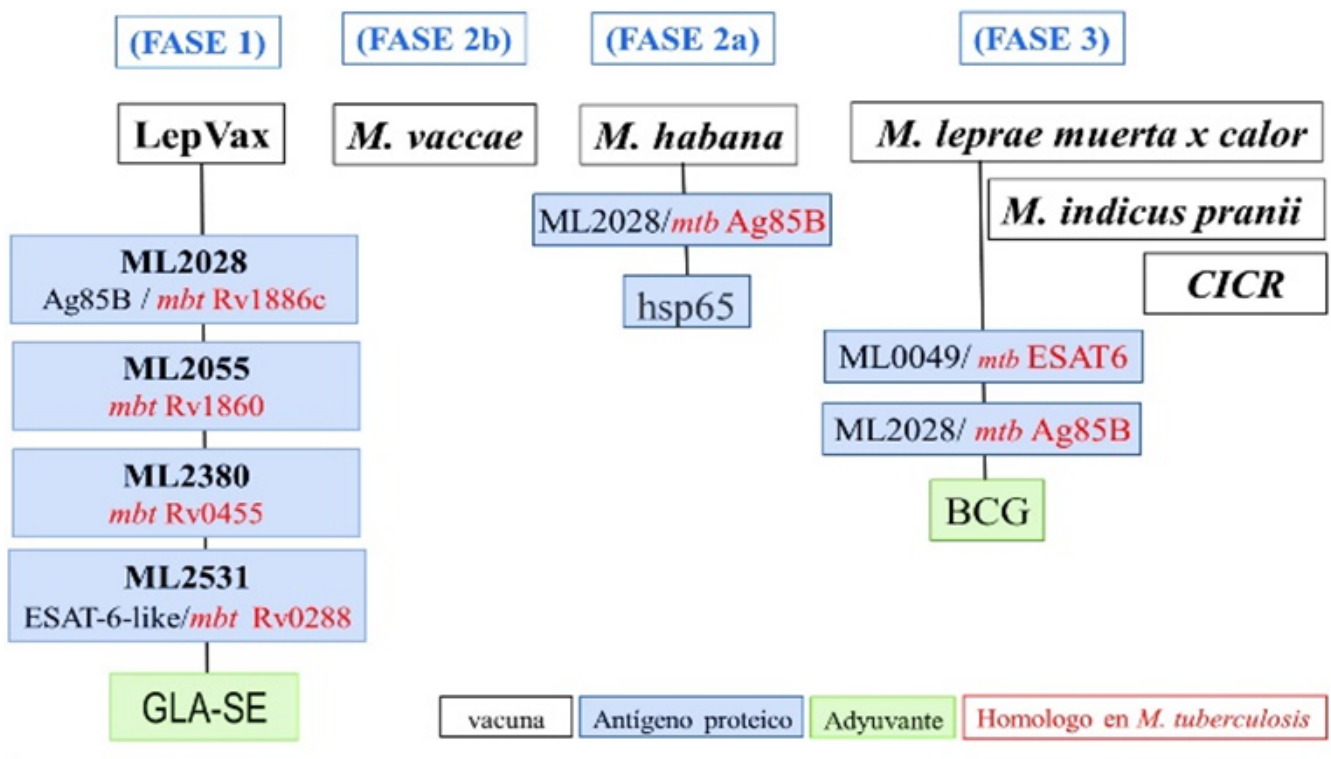


Figura 3. Vacunas desarrolladas en lepra.

capaz de aumentar la inmunogenicidad de una vacuna sin alterar desfavorablemente la seguridad del inmunógeno.

Los lipopolisacáridos (LPS) actualmente utilizados como adyuvantes en la elaboración de vacunas, son agonistas del receptor Toll like receptor 4 (TLR4). Es una molécula anfipática compleja que cubre la superficie externa de *Escherichia coli* (*E. coli*) y otras bacterias Gram negativas como *M. tuberculosis*. Fue el primer producto microbiano descubierto como agonista de TLR (Raman *et al.*, 2012). Aunque el lípido A se había definido como el resto hidrofóbico de LPS durante más de 50 años, la aclaración de la biosíntesis del lípido A no se logró hasta principios de los años ochenta. La capacidad de la molécula del lípido A "libre" para inducir regresión tumoral, choque endotóxico, producción de interferón y activación de macrófagos generó mucho interés fisiopatológico (Takayama *et al.*, 1983). La capacidad del TLR4 de utilizar las vías de señalización celular, del MyD88 (proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88) y TRIF (adaptador para responder a la activación de receptores tipo toll) han sido fundamentales para el éxito del lípido A como adyuvante. No está claro si una sola molécula TLR4 puede acceder a través de una o ambas rutas en ese momento, pero se ha sugerido que MyD88/MAL se requiere para la activación de TLR4 y para la producción de TNF. MyD88 activa el factor nuclear NF- $\kappa$ B, induciendo la producción de citocinas inflamatorias, mientras que la señalización a través de la vía TRIF / TRAM con los adaptadores, parece ser crucial para la producción de IL-6. Aún se requiere investigación adicional para definir los roles de estas dos vías de señalización en la activación de TLR4.

De los agonistas de TLR identificados, el Monofosforil Lípido A (MPL) es el más avanzado y actualmente es el único adyuvante con licencia disponible comercialmente en la actualidad. El adyuvante MPL ha demostrado ser un potente adyuvante de vacuna, pero aparentemente no tóxico cuando se administra con antígenos heterólogos. Con la finalidad de dividir sus efectos tóxicos de sus propiedades inmunomoduladoras se han identificado algunos derivados con potencial terapéutico. Estos

son: el Monofosforil Lípido A (MPL) y Glucopiranosil Lípido A (GLA) que en una formulación de emulsión estable de aceite en agua (SE) ayudó a mejorar su eficacia (Raman *et al.*, 2012). Varios estudios han demostrado que la inclusión de GLA-SE combinado con los biomarcadores específicos, induce una fuerte repuesta tipo Th1, con altos niveles de INF- $\gamma$ , y con niveles comparativamente bajos de citocinas tipo Th2 como IL-4 e IL-10 (Figura 3) (Coler *et al.*, 2011). Las inmunoglobulinas en suero también se vuelven sesgadas hacia una relación IgG1/ IgG2 más alta que al estar en presencia de GLA solo. Estudios demuestran que la respuesta a los adyuvantes es independiente de la dosis, orientando hacia una favorable respuesta tipo Th1 (Coler *et al.*, 2018). El GLA-SE es un adyuvante más potente en comparación al MLP-SE en términos de estimulación de la activación de células presentadoras de antígenos y la mayor inducción de INF- $\gamma$  por las células T. Las dosis bajas de GLA-SE son capaces de inducir una alta frecuencia de células T efectoras multifuncionales, por lo cual es el adyuvante ideal en la formación de estas nuevas vacunas (Figura 4) (Bertholet *et al.*, 2009). Los efectos de la formulación sobre el antígeno de la vacuna y la eficacia del adyuvante siguen siendo críticos. Esperamos que el avance en el estudio de los adyuvantes de vacunas permita desarrollar un compuesto estable capaz de proporcionar una herramienta efectiva para controlar la enfermedad.

## **Vacunas operativas en la enfermedad y su situación actual**

El desarrollo de una vacuna es un proceso largo y complejo que a menudo tarda de 10 a 15 años, e involucra la participación combinada de organizaciones públicas y privadas. Durante siglos, *M. leprae*, ha estado afectando a la humanidad independientemente del uso extensivo de antibióticos (PQT). Actualmente solo se han estudiado como probables vacunas ante la enfermedad de Hansen el *M. leprae* muerto por calor, el cual fue utilizado por primera vez en Venezuela por el Dr. Jacinto Convit, sirviendo de base para posteriores estudios de vacunas contra la lepra, como *Mycobacterium indicus pranii* (anteriormente conocido como *Mw*), *CICR*, el *M vaccae*

utilizado por primera vez en Vietnam y *M. habana*.

El *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) es comercializado con el nombre Immuvac / Cadi-05 por Cadila Pharmaceuticals para su uso como terapia complementaria de la lepra (Talwar, 2014). Comparte antígenos no solo con *M. leprae* sino también con *M. tuberculosis* y se ha empleado con éxito en el tratamiento de pacientes con tuberculosis de “difícil tratamiento” (Figura 3) (Sharma *et al.*, 2017). Ha demostrado una fuerte actividad inmunomoduladora en pacientes con lepra, tuberculosis, cáncer y en pacientes con verrugas genitales, donde su administración cambió la respuesta inmune del huésped hacia el tipo Th1. MIP se ha utilizado como complemento del régimen estándar de PQT acelerando la eliminación de bacterias. También acorta el período de recuperación (Talwar, 2014), y elimina los granulomas, pero se han observado episodios reaccionales. Siguiendo los estudios de Talwar y col, utilizando MIP, se ha reportado la eliminación del bacilo en los nervios periféricos restaurando la sensibilidad normal (Talwar *et al.*, 2017). Otros investigadores reportan que MIP tiene una eficacia protectora inducida por debajo de la de BCG (Coppola *et al.*, 2018). A pesar de estos resultados, MIP se evaluó también en un segundo ensayo doble ciego a gran escala con 9 años de seguimiento. En este estudio, se observó la eficacia protectora de MIP en contactos domésticos durante un periodo de seguimiento de 3 años. La protección reportada contra la lepra (68%) fue la más alta para una vacuna que no sea BCG. Sin embargo, su efecto protector disminuyó considerablemente después de 6 años (60%) y a los 9 años (28%) (Sharma *et al.*, 2005). A pesar de estos resultados contradictorios, MIP está siendo evaluado actualmente tanto como vacuna profiláctica como terapéutica contra la lepra en dos zonas hiperendémicas de la India, en combinación con una dosis única de rifampicina (Coppola *et al.*, 2018). Además, se planteó administrar 2 dosis de la vacuna MIP a intervalos de 6 meses en familiares y contactos de los pacientes, proyecto que inicio en mayo 2017 inicialmente en 5 distritos de alta endemicidad en la India y se extenderá a otros distritos en función de la eficacia observada con esta vacuna (Talwar *et al.*, 2017).

En el trayecto de investigación sobre una vacuna para la lepra han surgido muchas vacunas, entre estas *M. vaccae* que actualmente se encuentra en fase 2b, *M. habana* fase 2a, CICR y *M. leprae* muerta por calor que están en fase 3 (Figura 3) (Coppola *et al.*, 2018). Estas nuevas vacunas se están desarrollando para reemplazar o aumentar el efecto protector de la BCG, con ventaja sobre ella y pueden también ser utilizados con seguridad en individuos inmunocomprometidos. El *M. vaccae* aún se encuentra en evaluación por su habilidad para prevenir la lepra en pacientes o contactos de la India. El *M. habana* comparte epitopes similares o idénticos con el *M. leprae* como el Ag85B (Coppola *et al.*, 2018). Aunque la eficacia de estas vacunas ha sido cuestionable no se ha limitado su uso, ya que éstas han demostrado una respuesta favorable en dichas poblaciones de estudio. La respuesta obtenida por estas vacunas ha sido geográfico-dependiente.

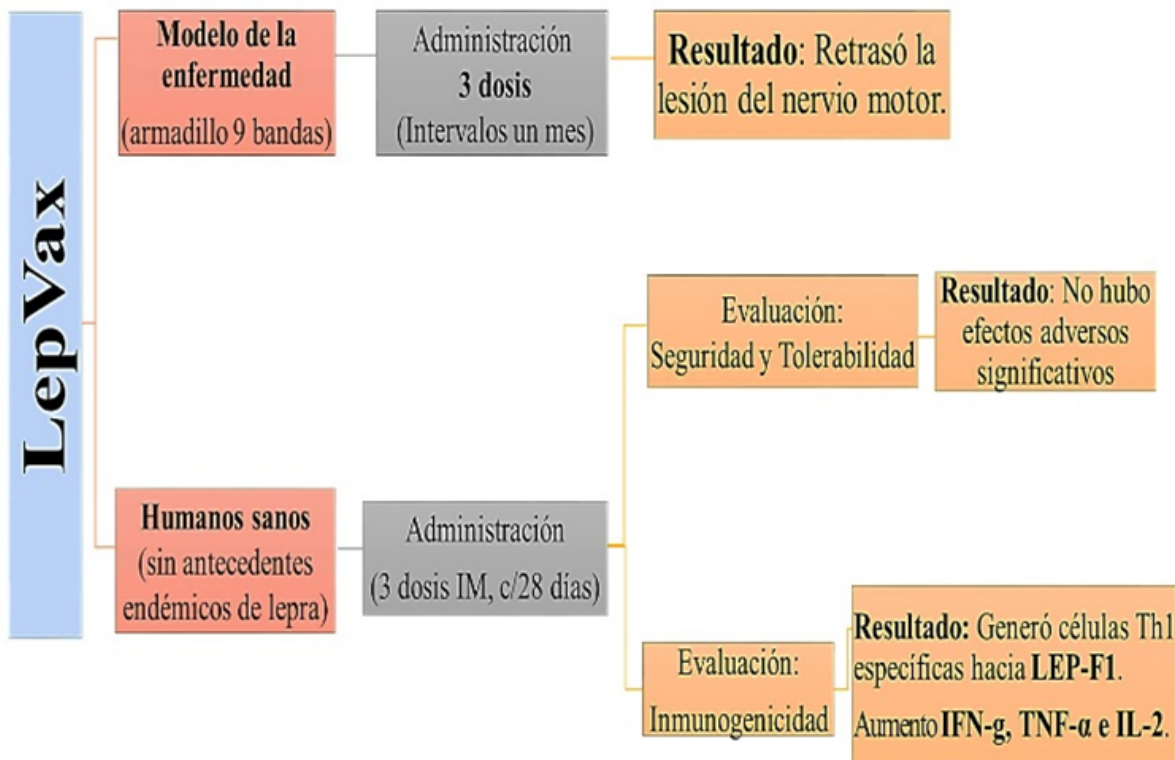
LepVax, es una vacuna de subunidad definida que comprende un conjunto de proteínas recombinantes que unen 4 Antígenos para *M. leprae*: ML2531, ML2380, ML2055 y ML2028, formulado con un adyuvante sintético Glucopiranosil Lípido A (GLA-SE) unido a una emulsión estable (Duthie *et al.*, 2018). Los componentes antigénicos de LepVax o LEP-F1 fueron expresado por *E. coli* para luego ensamblar una proteína quimérica de fusión de 89kDa que consiste en el enlace en tándem de los cuatro antígenos de *M. leprae* mencionados anteriormente. LepVax produjo una respuesta Th1 específica y redujo significativamente la carga infecciosa (Duthie *et al.*, 2018). Cuando se evaluó en armadillos de nueve bandas (modelo animal de enfermedad sintomática) se realizó un estudio profiláctico con la administración de 3 dosis de LepVax, a intervalos mensuales y en los resultados obtenidos se evidenció un retraso estadísticamente significativo en la lesión del nervio motor en comparación con la observada en los animales de control (Figura 4) (Duthie *et al.*, 2018). Es importante destacar que la administración de una vacuna compuesta por subunidad específica contra la tuberculosis con el adyuvante similar (ID93 + GLA-SE) no retrasó ni alivió los déficits de la función nerviosa, lo que indica que la eficacia probablemente

no esté mediada por la actividad de tipo adyuvante, sino más bien de una manera específica por el antígeno (Duthie *et al.*, 2018).

El resultado beneficioso proporcionado por LepVax se contraponen directamente a la rápida y severa precipitación a la conducción nerviosa anormal que ocurrió en los armadillos que recibieron la inmunización con BCG después de la exposición con el bacilo. Los datos de dos evaluaciones independientes demostraron que el empleo de LepVax en armadillos era seguro y retrasó el daño neurológico causado por infección por *M. leprae* (Figura 4). Más recientemente, se inició en los Estados Unidos una evaluación de seguridad (Fase 1) en adultos sanos. Duthie *et al.*, realizaron un ensayo donde se evaluó la seguridad y la inmunogenicidad de LepVax (LEP-F1 + GLA-SE). Para ello se reclutaron a sujetos sanos entre 18 y 55 años, sin antecedentes de viajes a un país endémico de lepra (Estados Unidos) con un objetivo principal de determinar la seguridad y tolerabilidad de dos dosis distintas recibidas de la vacuna candidata. El objetivo secundario fue evaluar la inmunogenicidad de la vacuna candidata mediante la evaluación de la durabilidad de las respuestas

mediadas por células Th1 a la proteína Lep-F1 (Figura 4) (Duthie *et al.*, 2019).

El primer grupo de tratamiento recibió LepVax vía intramuscular (IM), que constaba de una dosis 2 µg de LEP-F1. Cuando no se observó alteración a los 35 días, se aumentó a 10 µg LEP-F1 por inyección para el segundo grupo de tratamiento, ambas dosis mezcladas con 5 µg de formulación con adyuvante GLA-SE. Los sujetos en ambos grupos de tratamiento recibieron un total de tres inyecciones IM en el deltoides (intervalo de 28 días), una inyección en cada uno de los días 0, 28 y 56. Para realizar la evaluación de la respuesta inmune, se recolectó sangre de cada sujeto mediante punción venosa al inicio del estudio: día 0, día 7, 35 y 63. Para determinar las respuestas de anticuerpos específicos anti-LEP-F1, se obtuvo el suero del paciente donde se midió el isotipo IgG. En el análisis de las respuestas celulares inducidas por la inmunización con LEP-F1 + GLA-SE se demostró que la producción de citocinas proinflamatorias tipo Th1 aumentaron después de la incubación con LEP-F1 (Figura 4) (Duthie *et al.*, 2019). El ensayo presentado es la primera evaluación en humanos de una vacuna candidata contra la lepra creada a partir de subunidades.



**Figura 4.** Vacuna de Hansen empleada en modelo animal y en personas (Fase 1).

Se estudiaron los efectos adversos asociados con LepVax, los cuales fueron generalmente leves, transitorios y típicos de las vacunas por inyección intramuscular. La mayoría de los sujetos reportaron algo de sensibilidad y/o dolor en el lugar de inyección (83,3%), ningún sujeto se retiró debido a un efecto adverso. Entre los efectos adversos de la inyección reportados durante el período de seguimiento después del estudio (día 85-421), no se informaron en este período acontecimientos adversos entre los sujetos y tampoco ocurrieron muertes durante el estudio (Authie *et al.*, 2019). Para evaluar si existió una inmunización efectiva, Authie *et al.*, recolectaron sangre para medir las respuestas de anticuerpos anti-LEP-F1 en el suero de los pacientes tratados. Se evidenció que LepVax provocó una fuerte producción de anticuerpos circulantes IgG específicos y generó células Th1 específicas hacia LEP-F1, con el aumento de la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2.

Por ello, tanto la dosis de 2  $\mu$ g y 10  $\mu$ g de la proteína LEP-F1, fueron seguras, bien toleradas e inmunogénicas (Duthie *et al.*, 2019). Al evaluar la progresión en la escala de la dosis LEP-F1 de 2  $\mu$ g y 10  $\mu$ g en LepVax, se evidenció que no hubo alteración en la cinética de las respuestas de anticuerpos o citocinas específicas de antígeno, ni dio lugar a una mayor respuesta inmunológica. Estos datos sugieren que la dosis más baja del antígeno podría ser adecuada para estudios posteriores de eficacia, además se garantiza un mayor número de dosis disponibles de LEP-F1 (Duthie *et al.*, 2019). Una explicación sugerida para esto, en el contexto de la inmunogenicidad, es que una dosis de vacuna más alta, puede llevar a las células T a un estado de agotamiento con una menor avidez funcional y una mayor diferenciación a un estado terminal (Rhodes *et al.*, 2019), lo que finalmente se traduce en una menor respuesta inmunológica.

Esta vacuna podría tener un impacto sobre la salud mundial sólo si se cumplen una serie de requisitos, los cuales incluyen una seguridad adecuada, eficacia, el suministro, la estabilidad y el costo. Para ello se realizarán evaluaciones futuras en regiones endémicas de lepra para evaluar los perfiles de seguridad y respuesta inmune del LepVax en una población de

individuos asintomáticos y sintomáticos infectados por *M. leprae*. Por tanto, como una vacuna de subunidades LepVax puede ser producida a gran escala y a un costo suficientemente bajo para proporcionar una vacuna sostenible, es necesario realizar ensayos futuros que demuestren la eficacia de LepVax, y el grado de protección que esta pueda proporcionar frente a la enfermedad, y así convertirse en una estrategia mundial avalada por la OMS para el control de la lepra.

## CONCLUSIONES

La creación de una vacuna para la enfermedad de la lepra ha sido un trabajo arduo y multidisciplinario desde el año 1983 cuando Convit y colaboradores comenzaron sus estudios con el BCG más el *M. leprae* completo muerto por calor. Han sido muchos los prototipos de vacunas utilizando distintas micobacterias: *CIRC*, *M. vaccae*, *M. habana*, *M. leprae* muerto por calor, sin ningún efecto protector contra la enfermedad mayor que el de la vacuna de BCG sola y generando un efecto protector debatible geoespecífico. El *Mycobacterium indicus pranii* (MIC) es utilizado actualmente como inmunoterapia en algunas zonas, pero su eficacia a futuro debe ser mejor evaluada. Gracias a los avances en genómica y proteómica ha sido posible idear una vacuna formada por una subunidad específica de la bacteria que actúa estimulando la respuesta inmune en el paciente con lepra. Actualmente el LepVax ha sido la única vacuna creada según los avances en genómica que incluye todo el perfil tecnológico necesario. Esta es capaz de producir una respuesta Th1 reduciendo significativamente la carga infecciosa. Los resultados obtenidos en armadillos, modelo animal sintomático de la enfermedad han resultado satisfactorios ocasionando un retardo en el daño de la conducción nerviosa. Actualmente la vacuna LepVax se encuentra en sus primeras pruebas en seres humanos (fase 1) y hasta ahora estudios han demostrado que es segura entre individuos, sin efectos adversos graves. El impacto sostenido para la salud global solo ocurrirá si se logran cumplir varios requisitos, incluida la seguridad adecuada, la eficacia, adecuado suministro, consistencia y bajo costo. En el futuro solo con la búsqueda de una inmunoterapia eficaz,

se garantizarán las herramientas complementarias necesarias para el control de la enfermedad.

## REFERENCIAS

- AKAMA T, SUZUKI K, TANIGAWA K, et al. (2010). "Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application". *Jpn J Infect Dis* 63(6):387-392.
- ARANZAZU N, CONVIT J. (1984). "Vacuna contra la lepra". *Dermatol Venezol* 22:27-31.
- ARANZAZU N, PÉREZ F. (1994). "Inmunoterapia en lepra". *Dermatol Venezol* 32: 177-179.
- ÁVILA BJL (1996). "Imagen y huella de Jacinto Convit", En: *Capítulo Vacunas*. Editorial Intevep SA; Caracas, Venezuela. p.85-92.
- AVILA JL, CONVIT J. (1970). "Studies on cellular immunity in leprosy. I. Lysosomal enzymes". *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 38(4):359-364.
- BERTHOLET S, GOTO Y, CARTER L, et al. (2009). "Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis". *Vaccine* 27:7036-7045.
- CAMBAU E, SAUNDERSON P, MATSUOKA M, et al. (2018). "Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-2015". *Clin Microbiol Infect* 24:1-6.
- CAPECCHI B, SERRUTO D, ADUBOBIE J, et al. (2004). "The Genome Revolution in Vaccine Research". *Curr Issues Mol Biol* 6:17-28.
- COLE ST, ELGLMELER K, PARKHILL J, et al. (2001). "Massive gene decay in the leprosy bacillus". *Nature* 409(6823):1007-1011.
- COLER RN, BERTHOLET S, MOUTAFTSI M, et al. (2011). "Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant". *Plos one* 6(1): 16333.
- COLER RN, DAY TA, ELLIS R, et al. (2018). "The TLR-4 agonist adjuvant, GLA-SE, improves magnitude and quality of immune responses elicited by the ID93 tuberculosis vaccine: first-in-human trial". *npj Vaccines* 3(3): 1-9.
- CONVIT J, ARANZAZU N, PINARDI M, et al. (1979). "Immunological changes observed in indeterminate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda-negative contacts after the inoculation of a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG". *Clin Exp Immunol* 36(2):214-220.
- CONVIT J, ARANZAZU N, ULRICH M, et al. (1982). "Immunotherapy with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG in different forms of leprosy and in Mitsuda-negative contacts". *Int J Lepr* 50: 415-424.
- CONVIT J, ARANZAZU N, ULRICH M, et al. (1983). "Investigaciones relacionadas con el desarrollo de una vacuna contra la lepra". *Int J Lepr Otros Mycobact Dis* 51(4):531-539.
- CONVIT J, AVILA JL, GOIHMAN M, et al. (1972). "A test for the determination of competency in clearing bacilli in leprosy patients". *Bulletin of the World Health Organization* 46(6):821-826.
- CONVIT J, MONZÓN H, PINARDI ME, et al. (1979). "El desarrollo de una vacuna activa contra la lepra". *Acta Cient Venez* 30(5):491-493.
- CONVIT J, PINARDI ME, ARANZAZU N. (1976). "Comparative study of the 48-hour response to soluble antigens obtained from human and armadillo leprosy material in lepromatous leprosy patients and normal persons, contacts of leprosy patients". *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 44(1-2):284-286.
- CONVIT J, PINARDI ME, RODRÍGUEZ OCHOA G, et al. (1974). "Eliminación de *Mycobacterium leprae* posterior a la activación local in vivo de macrófagos en la lepra lepromatosa por otras micobacterias". *Clin Exp Immunol* 17(2): 261-265.
- CONVIT J, SAMPSON C, ZUNIGA M, et al. (1992). "Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results". *The Lancet* 339:446-450.
- COPPOLA M, VAN DEN EEDEN S, GELUK A, et al. (2018). "Vaccines for Leprosy and Tuberculosis". *Front Immunol* 308 (9):1-12.
- DE ROJAS V, HERNANDEZ O, GIL R, et al. (1994). "Some factors influencing delay in leprosy diagnosis". *Bull Pan Am Health Organ (PAHO)* 28(2):156-162.
- DUTHIE M, CASPER C, REED S. (2018). "Second coming: The re-emergence and modernization of immunotherapy by vaccines as a component of leprosy control". *Future Microbiol* 13:1449-1451.
- DUTHIE M, FREVOL A, DAY T, et al. (2019). "A phase 1 antigen dose escalation trial to evaluate safety, tolerability and immunogenicity of the leprosy vaccine candidate LepVax (LEP-F1 + GLA-SE) in healthy adults". *Vaccine* 38(7):1700-1707.
- DUTHIE M, GILLIS T, REED S. (2011). "Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine". *Human vaccines* 7(11):1172-1183.
- GELBER RH, BALAGON VF, CELLONA RV. (2004). "The relapse rate in MB leprosy patients treated with 2-years of WHO-MDT is not low". *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72:493-500.
- GELUK A, DUTHIE M, SPENCER J. (2011). "Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure", infection and leprosy disease. *Lepr Rev* 82(4):1-20.
- GOIHMAN-YAHR M, CONVIT J. (1972). "Cross reactivity of *Mycobacterium leprae* and BCG. A report on further studies". *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 40(1):62-67.
- GOMEZ-VALERO L, ROCHA EP, LATORRE A, et al. (2007). "Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction". *Genome Res* 17(8):1178-1185.
- GOULART IM, BERNARDES SOUZA DO, MARQUES CR, et al. (2008). "Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts". *Clin Vaccine Immunol* 15(1):101-105.

- GRANDI G. (2001). "Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics". *Trends Biotechnol* 19(5):181-188.
- GUPTA MD, VALLISHAYEE RS, ANANTHARAMAN DS. (1998). "Comparative leprosy vaccine trial in south India". *Indian J Lepr* 70(4):369-388.
- HANKS JH, FERNÁNDEZ JM. (1956). "Enhancement of resistance to murine leprosy by BCG plus specific antigen". *Int J Lepr* 24: 65-73.
- JIB, JAMET P, SOW S, et al. (1997). "High relapse rate among lepromatous leprosy patients treated with rifampin plus ofloxacin daily for 4 weeks". *Antimicrob Agents Chemother* 41(9):1953-1956.
- KARONGA PREVENTION TRIAL GROUP. (1996). "Randomized controlled trial of a single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi". *The Lancet* 348: 17-24.
- KATOCH VM, LAVANIA M, CHAUHAN DS, et al. (2007). "Recent advances in molecular biology of leprosy". *Indian J Lepr* 79(2-3):151-166.
- LI M, SONG S, YANG D, et al. (2015). "Identification of secreted proteins as novel antigenic vaccine candidates of *Haemophilus parasuis* serovar 5". *Vaccine* 33(14): 1695-1701.
- LOCKWOOD DN, REID AJ. (2001). "The diagnosis of leprosy is delayed in the United Kingdom". *QJM: An International Journal of Medicine* 94(4): 207-212.
- MAH N, PEREZ-IRATXETA C, ANDRADE-NAVARRO MA. (2010). "Outer membrane pore protein prediction in mycobacteria using genomic comparison". *Microbiology* 156(8):2506-2515.
- MATSUOKA M, KASHIWABARA Y, NAMISATO M. (2000). "A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparfloxacin". *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68(4):452-455.
- MBOW ML, DE GREGORIO E, VALIANTE NM. (2010). "New adjuvants for human vaccines". *Curr Opin Immunol* 22(3):411-416.
- MERLE CS, CUNHA S, RODRIGUES L. (2010). "BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control". *Expert Rev Vaccines* 9(2):209-222.
- MITSUDA K. (1916). "Skin Reaction in Leprosy". *Jap Jour of Urol Derm*.
- RAMAN V, DUTHIE M, FOX CH, et al. (2012). "Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application". *Front Immunol* 144 (3):1-15.
- RANA A, THAKUR S, BHARDWAJ N, et al. (2016). "Excavating the surface-associated and secretory proteome of *Mycobacterium leprae* for identifying vaccines and diagnostic markers relevant immunodominant epitopes". *Pathog Dis* 74(9): 1-26.
- RANA A, KUMAR D, RUB A, et al. (2015). "Proteome-scale identification and characterization of mitochondria targeting proteins of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: potential virulence factors modulating host mitochondrial function". *Mitochondrion* 23:42-54.
- RANA A, RUB A, AKHTER Y. (2014). "Proteome-scale identification of outer membrane proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a structure based combined hierarchical approach". *Mol Biosyst* 10(9):2329-2337.
- RAPPUOLI R. (2000). "Reverse vaccinology". *Curr Opin Microbiol* 3(5): 445-450.
- RHODES SJ, KNIGHT GM, KIRSCHNER DE, et al. (2019). "Dose finding for new vaccines: the role for immunostimulation/immunodynamic modelling". *J Theor Biol* 465:51-55.
- RIDLEY DS, JOPLING WH. (1996). "Classification of leprosy according to immunity. A five group system". *Int J Lepr Other Mycobat Dis* 34(3):255-273.
- SHARMA P, MUKHERJEE R, TALWAR GP, et al. (2005). "Immunoprophylactic effects of the anti-leprosy *Mu* vaccine in household contacts of leprosy patients: clinical field trials with a follow up of 8-10 years". *Lepr Rev* 76(2):127-143.
- SHARMA SK, KATOCH K, SARIN R, et al. (2017). "Efficacy and Safety of *Mycobacterium indicus pranii* as an adjunct therapy in Category II pulmonary tuberculosis in a randomized trial". *Sci Rep* 7: 3354.
- SINGH P, COLE ST. (2011). "*Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity". *Future Microbiol* 6(1):57-71.
- SPENCER JS, KIM HJ, WHEAT WH, et al. (2011). "Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy". *Clin Vaccine Immunol* 18(2): 260-267.
- TAKAYAMA K, QURESHI N, MASCAGNI P, et al. (1983). "Fatty acyl derivatives of glucosamine-1-phosphate in *Escherichia coli* and their relation to lipid A. Complete structure of A diacylGlcN-1-P found in a phosphatidylglycerol-deficient mutant". *J Biol Chem* 258:7379-7385.
- TALWAR GP. (2014). "Leprosy is in principle eradicable: a possible approach". *Curr Sci* 106(10):1344-1345.
- TALWAR GP, GUPTA JC. (2017). "Launching Of Immunization with the Vaccine *Mycobacterium Indicus Pranii* for Eradication of Leprosy in India". *Int J Vaccine Res* 3:1-5.
- TRUOC LV, LY HM, THUY NK, et al. (2001). "Vaccination against leprosy at Ben San Leprosy Centre, Ho Chi Minh City, Vietnam". *Vaccine* 19:3451-3458.
- VAN VEEN NH, MEIMA A, RICHARDUS JH. (2006). "The relationship between detection delay and impairment in leprosy control: a comparison of patient cohorts from Bangladesh and Ethiopia". *Lepr Rev* 77(4):356-365.
- WASHBURN MP, YATES JR. (2000). "Analysis of the microbial proteome". *Curr Opin Microbiol* 3(3): 292-297.
- WILLIAMS DL, GILLIS TP. (2004). "Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*". *Lepr Rev* 75(2): 118-130.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010). "Weekly epidemiological record: Global Leprosy Situation". *Wkly Epidemiol Rec* 85(35):337-348.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). "Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy". *Wkly*

*Epidemiol Rec 93(35):444–456.*

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). "BCG vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec 93(8):73-96.*

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2019). *Weekly epidemiological record: Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. Wkly Epidemiol Rec 94(35/36):389-412*

YOU EY, KANG TJ, KIM SK, et al. (2003). "Mutations in genes related to drug resistance in *Mycobacterium leprae* isolates from leprosy patients in Korea". *J Infect 50(1):6–11.*

ZULUETA AM. (1994). "Evolución histórica, epidemiología y medidas de control". *Dermatol Venezol 32(4):181-190.*

# Pruebas inmunológicas diagnósticas en la enfermedad de Hansen

**Elsa Rada<sup>1</sup>**

elsa.rada@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1301-0462>

**Lucibel Crespo<sup>1</sup>**

lucibelcrespo@gmail.com

**Ramón Guevara<sup>2</sup>**

drmonra@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

La enfermedad de Hansen presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas e histopatológicas, las cuales son un reflejo de la naturaleza de la respuesta inmunológica del individuo ante diversos componentes del *Mycobacterium leprae*. La interacción entre el sistema inmune del huésped y diferentes componentes micobacterianos nos permite conocer aspectos de la respuesta inmunológica diferencial tanto serológica como respuesta celular en los pacientes con enfermedad de Hansen. En este trabajo se trata de resumir los avances en las últimas 4 décadas realizados en la enfermedad de Hansen sobre las pruebas inmunológicas diagnósticas (hipersensibilidad retardada HR, proliferación celular *in vitro* y pruebas de anticuerpos) aplicadas tanto en el Instituto de Biomedicina como ensayos actualizados realizados en otras diferentes instituciones en zonas endémicas de la enfermedad de Hansen.

**Palabras Clave:** Pruebas inmunológicas; enfermedad de Hansen; Diagnóstico; Lepra

## IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTIC TESTS IN HANSEN'S DISEASE

### ABSTRACT

Hansen's disease has a wide spectrum of clinical and histopathological manifestations, which are a reflection of the nature of the individual's immune response to various components of *Mycobacterium leprae*. The interaction between the host's immune system and different mycobacterial components allows us to know aspects of the differential immune response both serological and cellular response in patients with Hansen's disease. This paper involves summarizing the advances in the lasts 4 decades in Hansen's disease on diagnostic immunological testing (delayed hypersensitivity HR, *in vitro* cell proliferation and antibody tests) applied at both the Biomedicine Institute and updated trials conducted in other different institutions in areas endemic to Hansen's disease.

**Keywords:** Immune tests; Hansen's disease; Diagnostic; Leprosy

## INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infecciosa de baja transmisibilidad, no hereditaria. Hasta la primera década del siglo XXI y desde muchas décadas antes sólo se conocía el *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) como único causante de la enfermedad, pero desde el 2008 se ha implicado otra especie de micobacteria, el *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*) como agente de un tipo de lepra grave, la lepra lepromatosa difusa o lepra de Lucio la cual se expresa clínicamente con grandes zonas de necrosis (Han *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2015). El bacilo tiene preferencia por la piel y los nervios periféricos, pero puede afectar cualquier órgano menos el sistema nervioso central y los pulmones; sin embargo el *M. lepromatosis* está señalado de producir una enfermedad vascular causada por la invasión micobacterial de los vasos con vasculitis y oclusión vascular y con una alta morbilidad y mortalidad (Han *et al.*, 2013). Ambos son bacilos intracelulares obligatorios y no son cultivables en ningún medio. La lepra es una enfermedad granulomatosa crónica y en el caso de la lepra producida por el *M. leprae*, sus formas clínicas se presentan en forma de espectro por la interacción del sistema inmunitario del huésped ante la invasión de la micobacteria.

La enfermedad de Hansen es una enfermedad de evolución lenta que se presenta con mayor frecuencia en la población adulta. Sin embargo en la infancia representa un problema de salud pública ya que refleja la transmisión activa de la enfermedad en la población y una exposición temprana al bacilo.

Una vez que el bacilo penetra al organismo, es fagocitado por los macrófagos y por las células dendríticas, produciéndose una primera fase donde actúa la inmunidad innata del individuo estableciéndose la infección, se produce una interacción entre la inmunidad del individuo y los mecanismos de evasión del *M. leprae* que trata de evadir los mecanismos de defensa del huésped.

Algunas veces las lesiones pasan desapercibidas y se confunden con otras patologías, entre ellas, enfermedades que cursan con máculas hipocrómicas: *Pitiriasis alba*, *Pitiriasis versicolor*, vitíligo, nevus

acrónico o lesiones residuales tales como, hipocromía post inflamatorias y lesiones de psoriasis. También tenemos enfermedades con placas eritematosas: granuloma anular, *Tinea corporis*, esclerodermia, lupus eritematoso subagudo y sarcoidosis. Enfermedades que evolucionan con numerosas lesiones de tipo macular, placas y nódulos: leishmaniasis difusa, neurofibromatosis, sífilis, xantomatosis, linfomas, eritema multiforme y granulomatosis por sustancias inertes (Aranzazu, 1994).

La lepra se presenta en la edad adulta temprana con discapacidades por lo tanto su diagnóstico precoz, el adecuado manejo, el tratamiento específico de la misma, junto con el de la neuritis y los fenómenos reaccionales contribuirán a la disminución de las secuelas incapacitantes y a su erradicación definitiva. En la mayoría de los casos el diagnóstico clínico es tardío, ya que solo es posible realizarlo, una vez que se ha iniciado la sintomatología con la presencia de lesiones cutáneas y el daño de los nervios comprometidos.

En 1962 se desarrolló un sistema de clasificación basada en la correlación clínico, inmunológica e histopatológica. En el espectro de la enfermedad se encuentran las siguientes formas: Tuberculoide (LT), Bordeline Tuberculoide (BT), Bordeline Bordeline (BB), Bordeline Lepromatosa (BL) y Lepromatosa (LL). Desde la introducción de la poliquimioterapia (PQT), la organización mundial de la salud (OMS) establece una clasificación en Paucibacilar (PB) y Multibacilar (MB) basándose en la carga bacilar del paciente y posteriormente se tomó en cuenta el número de lesiones y los nervios involucrados, siendo muy útil para la asignación de grupos de tratamiento (Ridley *et al.*, 1966; WHO, 2000).

El tratamiento de la lepra tanto para adultos como niños usando poliquimioterapia (PQT) está formado por tres drogas antimicobacterianas: dapsona, rifampicina y clofazimina; 6 meses para pacientes PB y 12 meses para las formas clínicas MB, siempre tomando en cuenta que existen empaques ajustados por la OMS para niños de 10 a 14 años y para los menores de 10 años, la dosis debe ser ajustada al peso corporal (WHO, 2018).

## Pruebas inmunológicas *in vivo* e *in vitro*

El diagnóstico temprano es uno de los mayores obstáculos en el control de la enfermedad. En el estudio inmunológico se evalúa la respuesta celular tanto *in vivo* como *in vitro* y la respuesta humoral. Mucho antes del conocimiento del genoma del *Mycobacterium leprae* y de pruebas serológicas muy específicas para el diagnóstico de la enfermedad, se contaba con dos tipos de antígenos para medir la respuesta celular *in vivo*: El Mitsuda y el antígeno proteico completo de *M. leprae*. El Mitsuda o lepromina-H es un antígeno particulado del cuerpo bacilar, la cual está en desuso porque su preparación es a partir de material de armadillo infectado y en la actualidad no se cuenta en ninguna parte del mundo con colonias de armadillos para la obtención del mismo. La reacción positiva de Mitsuda tuvo un valor pronóstico y permitió clasificar y pronosticar el estado de resistencia ante la enfermedad (Krotoski *et al.*, 1993). El antígeno soluble proteico de *M. leprae* (antígeno Convit) preparado y utilizado durante varias décadas en el Instituto de Biomedicina, se utilizó en diferentes pruebas entre ellas están, las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada (HR) y en estudios *in vitro* tanto en la respuesta inmunológica mediada por células como en los estudios *in vitro* en la respuesta de anticuerpos. Para la obtención del antígeno proteico completo de *M. leprae*, inicialmente se procedió a la purificación del bacilo siguiendo el protocolo de Draper (Draper, 1979), proveniente del tejido de armadillo infectados experimentalmente. La obtención del extracto proteico de *M. leprae* utilizado para las pruebas de HR se procesó en el laboratorio de Inmunología II bajo la dirección de la Dra. Marian Ulrich<sup>†</sup>, coordinadora del laboratorio, donde una fracción proteica del sobrenadante se obtuvo mediante la ruptura parcial de los bacilos purificados utilizando una celda de presión (prensa francesa), bajo una presión de 10.000 libras. El extracto obtenido de esta manera fue subfraccionado al pasarlo a través de un sistema de ultrafiltración Amicon, luego se utilizó una membrana PM-30 que retiene moléculas por encima de 30.000 daltons y la fracción obtenida fue un antígeno de bajo peso molecular (Ulrich *et al.*, 1986). El antígeno soluble fue una prueba usada en su

momento para medir infección y se comportó como un antígeno de tipo tuberculínico donde la lectura se realiza a las 48 horas y se considera positiva una induración  $\geq$  de 12 mm (Pinaridi *et al.*, 1994), la cual tuvo problemas de especificidad al presentar sensibilidad cruzada con el PPD (Gupte *et al.*, 1990). En base a los estudios preliminares utilizando el antígeno Convit y el antígeno Rees, se han concentrado los esfuerzos en preparar nuevos antígenos para pruebas cutáneas en la enfermedad de Hansen (Brennan, 2000). Estos antígenos de segunda generación son: MLSA-LAM, antígeno soluble desprovisto de lipoglicanos principalmente la molécula lipoarabinomano y el MLC-WA antígeno proteico de pared celular los cuales han sido ensayados en conejillos de india encontrándose una fracción proteica de la membrana del *M. leprae* prometedora para estudios en las pruebas intradérmicas. Recientemente estudios realizados con estos antígenos anteriormente señalados se probaron en regiones no endémicas de Hansen (USA) (Brennan, 2000). En los primeros ensayos ejecutados en fase I, los individuos recibieron tres dosis (2,5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g y 0,1 $\mu$ g) de cada uno de los antígenos paralelamente con el antígeno Rees MLSA luego se realizó un ensayo doble ciego (fase II) en zona endémica (Nepal) donde colocaron una dosis alta y una baja dosis (1 $\mu$ g y 0,1 $\mu$ g) dividieron la población (BL/LL, BT/TT,TB) y no casos; donde resultó que estos antígenos fueron seguros para el uso en humanos pero la sensibilidad obtenida fue baja (20-25%) y concluyen que estos antígenos no son adecuados para ser utilizados en pruebas de piel para la detección temprana de la enfermedad. Sin embargo, el grado de especificidad fue bastante alto por no presentar reacción cruzada con individuos que presentaron tuberculosis (TB) (Rivoire *et al.*, 2014a; Rivoire *et al.*, 2014b).

Continuando los progresos, para obtener una verdadera incidencia de la enfermedad y su impacto sobre la transmisión, es imperativo obtener una combinación de antígenos múltiples, sensibles y específicos para detectar una infección temprana con *M. leprae*. Actualmente, en vista de la alta prevalencia de casos de lepra en áreas endémicas como India, Brasil, Bangladesh y Filipinas, se realizó una prueba de

hipersensibilidad retardada en modelos animales (conejiños de india y armadillos). La proteína de *M. leprae* sensible y específica que se utilizó en el estudio, es la proteína quimérica (LID-1) la cual es capaz de distinguir entre animales infectados y no infectados presentando manifestaciones de HR similares a las presentes en pacientes PB (Duthie *et al.*, 2020).

### Respuesta inmunológica mediada por células *in vitro*.

Durante la década del 1980, se realizaron en el Instituto de Biomedicina ensayos de proliferación celular de linfocitos en sangre venosa periférica en pacientes LL, BL, LT y personas sanas contactos. Estos ensayos se basaron en la respuesta de los linfocitos frente a antígenos como: el bacilo Calmette-Guérin (BCG) muerto por calor, *M. leprae* purificado y extracto soluble de *M. leprae*, donde se encontró que el tratamiento combinado utilizado por Convit y colaboradores, PQT más inmunoterapia (IMT), mostró una respuesta inmune persistente frente al extracto proteico soluble de *M. leprae* y BCG (Rada *et al.*, 1987; Rada *et al.*, 1994; Rada *et al.*, 1997b). La IMT consistió en utilizar dos microorganismos; el *M. leprae* muerto por el calor y la bacteria BCG atenuada, cuyo tratamiento se utilizó conjuntamente con PQT en pacientes con Lepra Indeterminada LI, BL y LL, llevando a conversión la reactividad intradérmica, degradación de los bacilos en la piel y marcada mejoría clínica. Continuando los estudios y con los buenos resultados obtenidos con el extracto proteico de *M. leprae* en los ensayos de proliferación celular, se seleccionaron varias fracciones proteicas con diferentes movilidades relativas de peso molecular (kDa). Para el fraccionamiento se realizó la técnica bioquímica electroforesis en poliacrilamida-SDS donde se observó una respuesta celular incrementada en cuatro fracciones proteicas, cuyos rangos fueron entre 66-65, 45-29, 22-18 y 14 kDa. Los primeros respondedores fueron los Contactos Mitsuda positivos, seguido de los pacientes tuberculoide, luego pacientes lepromatosos tratados con PQT más IMT (Rada *et al.*, 1991).

Siguiendo la búsqueda de proteínas más específicas para seguir los estudios de reactividad celular *in vitro*

se solicitó al banco de proteínas recombinantes (OMS), una serie de proteínas micobacterianas tanto de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae* de diferentes pesos moleculares, *M. tuberculosis* 70kDa, *M. bovis* 65 kDa, *M. leprae* 36, 28, 18 y 10 kDa, donde algunas proteínas ensayadas son proteínas de choque térmico y presentaron reactividad cruzada con sus homólogas en humanos sanos. Se pudo evidenciar que en la proteína completa de *M. leprae* deben haber otros componentes homólogos al extracto proteico de BCG que sean capaces de estimular la respuesta celular en los pacientes (Rada *et al.*, 1997b).

En el año 2001, a raíz de la disponibilidad de la secuencia completa del genoma del bacilo de la lepra se han obtenido secuencias genéticas que codifican a diferentes proteínas de *M. leprae* (Vissa *et al.*, 2001). Han sido muchos los progresos en la investigación post genómica, con la finalidad de encontrar los antígenos proteicos que puedan ser útiles en obtener una buena respuesta celular protectora. Durante las últimas dos décadas se han examinado alrededor de 200 proteínas bien definidas y caracterizadas con diferentes movilidades relativas utilizadas en diferentes ensayos inmunológicos (Geluk *et al.*, 2011). Recientemente, los ensayos celulares continúan utilizando biomarcadores para detección de inmunidad innata y adaptativa como de inmunidad humoral en diferentes regiones endémicas del planeta (Asia, África, Sur América). Estos estudios han señalado su importancia en la detección de individuos con baja carga bacilar contribuyendo a la detección temprana de la enfermedad (Van Hooij *et al.*, 2016; Van Hooij *et al.*, 2018; Van Hooij *et al.*, 2019).

### Actividad serológica (estudios *in vitro* en la inmunidad humoral).

Sabemos que dependiendo del espectro clínico de la enfermedad, los pacientes de lepra pueden caracterizarse por tener una reactividad elevada de anticuerpos en pacientes multibacilares (LL/BL/BB) conjuntamente con una respuesta celular disminuida dirigida a antígenos del *M. leprae*, con un comportamiento inverso en los pacientes Paucibacilares (LI/LT/BT).

El glicolípido fenólico-I (GLP-I) fue descubierto en

1981, reportan que es un antígeno inmunodominante de la cubierta del *Mycobacterium leprae* (Hunter *et al.*, 1981). La detección de anticuerpos circulantes IgM anti GLP-I, a través de la metodología ELISA (ensayo inmunoenzimático) ha sido ampliamente usada como método diagnóstico en diferentes parte del mundo, sin embargo se ve limitado su valor diagnóstico en pacientes PB, ya que estos tienen índice bacteriano bajo o indetectable y estos últimos se caracterizan por su buena respuesta celular, en lugar de la respuesta humoral. En el Instituto de Biomedicina varios estudios se han realizados referentes a la respuesta de anticuerpos utilizando el GLP-I.

Durante aproximadamente dos décadas se utilizó el GLP-I nativo como método diagnóstico inmunológico para identificar a los pacientes que presentaban diferentes carga bacilar. Para el año 1991 se aplicó esta prueba a 29.113 contactos de pacientes lepromatosos en zonas endémicas de Venezuela (Táchira, Mérida y Apure) que fueron vacunados con la inmunoterapia, desarrollada por el Dr. Convit donde se evidenciaron 28 contactos con pruebas positivas frente al GLP-I. La mayoría de las lesiones encontradas fueron incipientes y que luego desaparecieron espontáneamente (Ulrich *et al.*, 1991; Convit *et al.*, 1992; Convit *et al.*, 1993).

Mientras que las pruebas para la detección de anticuerpos IgM hacia el GLP-I se utilizan para ciertas aplicaciones, el uso de esta prueba no es adecuada para estudios epidemiológicos debido al registro de una proporción significativa de individuos sanos que pueden presentar positividad frente al GLP-I.

En el sentido de lograr una prueba más específica, sencilla y con capacidad de realizar detecciones tempranas de la enfermedad, se amplía el estudio en la utilización del GLP-I, evidenciándose en su estructura química la presencia de un segmento disacárido externo, lográndose la síntesis de esta neoglicoproteína, la cual se somete a múltiples variaciones químicas, hasta hacerla capaz de unirse a la albumina bovina, dando lugar a lo que se conoce hoy en día como natural di o trisacárido octyl ligado a albúmina de suero bovino (ND-o-BSA ó NT-O-BSA) (Brennan *et al.*, 1994).

Es importante señalar que el conocimiento y

secuenciación del genoma micobacteriano, ha dado nuevas directrices para la búsqueda y síntesis de marcadores proteicos que permitan desarrollar nuevas alternativas para realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad (Vissa *et al.*, 2001).

### Desafíos post genómicos

Se basan en conseguir una prueba de laboratorio que sea capaz de diagnosticar la enfermedad en personas asintomáticas o predecir la progresión de la enfermedad en áreas endémicas (Stefani, 2008; Lobato *et al.*, 2011), así como también en conseguir antígenos para ensayos serológicos altamente específicos que conjuntamente con el GLP-I permitan mejorar la sensibilidad en el diagnóstico (Reece *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 2012).

Duthie y colaboradores demostraron que las proteínas micobacterianas (ML0405 y ML2331) son antígenos del *M. leprae* con un potencial diagnóstico en los pacientes con lepra multibacilar independiente de la ubicación geográfica y/o zonas endémicas. Además plantearon la construcción de una proteína de fusión entre las proteínas ML0405 y la ML2331 llamada LID-1 la cual puede proporcionar una herramienta de diagnóstico antes de la aparición de signos y síntomas clínicos (Duthie *et al.*, 2008). Por lo tanto, a pesar de que *M. leprae* posee niveles de homología con otras especies de micobacterias, estas proteínas sólo se reconocen en el contexto de la lepra. Las mencionadas proteínas, se probaron en individuos contactos, de zonas endémicas en Venezuela que habían sido vacunados previamente con BCG y no desarrollaron respuesta serológica frente a LID-1 (Duthie *et al.*, 2011; Rada *et al.*, 2012). Actualmente, se han utilizado el GLP-I sintético (ND-o-BSA) antigénicamente activo o inmunodominante unido con la proteína de fusión LID-1 en diferentes regiones (ND-o-LID-1). Estudios realizados en Venezuela determinaron la respuesta de anticuerpos dirigida hacia el conjugado ND-o-LID-1 y sus componentes individuales LID-1 y ND-o- HSA en individuos del Caserío Mamaría ubicado en el Estado Portuguesa. Se incluyeron 167 individuos, clasificados en casos y contactos. Clínicamente se confirmaron 37,1% casos (62/167), de los cuales 71% (44/62) eran Paucibacilares

y 29% (18/62) Multibacilares. Al comparar la respuesta de anticuerpos entre los casos de Hansen y contactos, se observó una diferencia estadísticamente significativa (16,13% versus 5,7%, respectivamente,  $p=0,013$ ). Al determinarse la filiación familiar de los individuos incluidos en el estudio, se detectaron tres familias de interés: C, T y H. Los casos de Lepra presentes en las tres familias representan el 42% de los casos totales, registrándose en la familia C todas las formas clínicas de esta enfermedad. Los resultados obtenidos en dicho caserío sugieren que los marcadores empleados en este trabajo son de gran utilidad para ser empleados como herramienta auxiliar para el diagnóstico de la enfermedad de Hansen en los casos multibacilares (Rada *et al.*, 2019).

Este conjugado (ND-o-BSA) ha sido probado también en diferentes regiones Brasil, Cebú Filipinas, China tanto en pacientes MB y PB, contactos de zonas endémica de la región, pacientes con tuberculosis y personas sanas demostrando una mayor sensibilidad y especificidad comparada con el GLP-I nativo y con el sintético, ND-o-BSA (Qiong-Hua *et al.*, 2013). Aunque la utilización de una prueba rápida (RDT) no ha sido lo suficientemente sensible para la detección de casos con baja carga bacilar, por lo que se han hecho modificaciones añadiendo al conjugado la proteína A para aumentar la sensibilidad (Jian *et al.*, 2020; Vaz Cardoso *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2018).

Gracias a los estudios realizados con técnicas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando fracciones específicas de ADN de *M. leprae*, método de cierta rigurosidad, se logra un diagnóstico seguro, principalmente cuando hay pocos bacilos. La utilización del conjugado ND-o-LID-1, con biomarcadores proteicos específicos para *M. leprae* y métodos complementarios con PCR permiten conocer respuestas tanto de inmunidad innata como de inmunidad adquirida. Datos obtenidos en regiones endémicas para el monitoreo de contactos y haciendo uso de modelos matemáticos, los resultados han permitido diagnosticar casos de lepra con una alta sensibilidad y especificidad y a su vez la identificación temprana de nuevos casos entre los contactos domésticos (Gama *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

La finalidad de la estrategia mundial que se plantea para la eliminación de la lepra 2016-2020 tiene como objeto acelerar la acción hacia un mundo sin la enfermedad. Su fundamento se basa en la detección temprana de los casos utilizando biomarcadores tanto de la inmunidad innata como adquirida y de esta manera aplicar los programas de salud, antes de la aparición de las discapacidades presentes en esta enfermedad.

## REFERENCIAS

- ARANZAZU N. (1994). "Enfermedad de Hansen: Etiología, Clínica y Clasificación". *Dermatol Venez* 32(4):145-151.
- BRENNAN PJ, CHATTERJEE D, FUJIWARA T, *et al.* (1994). "Leprosy-specific neoglycoconjugates: synthesis and application to serodiagnosis of leprosy". *Methods Enzymol* 242: 27-37.
- BRENNAN PJ. (2000). "Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens and an approach to the second generation". *Leprosy Rev* 71:550-54.
- CONVIT J, SAMPSON C, ZUNIGA M, *et al.* (1992). "Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results". *Lancet* 339: 446-450.
- CONVIT J, SMITH PG, ZUNIGA M, *et al.* (1993). "BCG vaccination protects against leprosy in Venezuela: A case-control study". *Int J Leprosy* 61:185-191.
- DRAPER P. (1980). "Purification of *M. leprae*". *Protocol 1/79. Report of the enlarged Steering Committee meeting Geneva, 7-8 February, Annex 1, Geneva: World Health Organization, TDR/IMMLEP-SWG (5)/80.3.*
- DUTHIE MS, IRETON GC, KANAUJJA GV, GOTO W, *et al.* (2008). "Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis". *Clin Vaccine Immunol* 15(10): 1590-1597.
- DUTHIE MS, HAY MN, RADA EM, CONVIT J, ITO L, *et al.* (2011). "Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treated efficacy and as recurrence prognostic markers". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1257-1265.
- DUTHIE MS, PENA MT, KHANDHAR AP, PICONE A, *et al.* (2020). "Development of LepReact, a defined skin test for paucibacillary leprosy and low-level *M. leprae* infection". *Appl Microbiol Biotechnol* 104:3971-3979.
- GAMA RS, SOUZA MLM, SARNO EN, MORAES MO, GONÇALVES A, STEFANI MMA, GARCIA RMG, FRAGA LAO. (2019). "A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst

- household contacts". *PLoS Negl Trop Dis* 13(6):1-22.
- GELUK A, DUTHIE MS, SPENCER J. (2011). "Post genomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease". *Lepr Rev* 82: 1-20.
- GUPTA MD, ANANTHARAMAN DS, NAGARAJU B, KANNAN S, VALLISHAYEE RS. (1990). "Experiences with *Mycobacterium leprae* soluble antigens in a leprosy endemic population". *Lepr Rev* 61: 132-144.
- HAN XY, SEO YH, SIZER KC, SCHOBERLE T, et al. (2008). "A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy". *Am J Clin Pathol.* 130:856-864.
- HAN XY, JESSURUN J. (2013). "Severe leprosy reactions due to *Mycobacterium lepromatosis*". *Am J Med Sci* 345(1): 65-69.
- HAN XY, MISTRY NA, THOMPSON EJ, TANG HL, et al. (2015). "Draft genome sequence of new leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis*". *Genome Announc* 3(3): 1-2.
- HUNTER SW, BRENNAN PJ. (1981). "A novel glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity". *J Bacteriol* 147:728-735.
- JIAN L, XIUJIAN S, YUANGANG Y, YAN X, LIANCHAO Y, DUTHIE MS, YANA W. (2020). "Evaluation of antibody detection against the NDO-BSA, LID-1 and NDO-LID antigens as confirmatory tests to support the diagnosis of leprosy in Yunnan province, southwest China". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 114(3):193-199.
- KROTOSKI WA, MROCZKOWSKI TF, REA TH, ALMODOVAR PI, CLEMENTS BC, et al. (1993). "Lepromin skin testing in the classification of Hansen's disease in the United States". *Am J Med Sci* 305: 18-24.
- LOBATO J, COSTA MP, REIS EDE M, GONÇALVES MA, et al. (2011). "Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection". *Lepr Rev* 82(4):389-401.
- MUÑOZ M, BELTRAN-ALZATE JC, DUTHIE MS, SERRANO-COLL H, CARDONA-CASTRO N. (2018). "Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay using either natural octyl disaccharide-leprosy IDRI diagnostic or phenolic glycolipid-I antigens for the detection of leprosy patients in Colombia". *Am J Trop Med Hyg* 98(1): 274-277.
- VAZ CARDOSO LP, DIAS RF, FREITAS AA, et al. (2013). "Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using Smart Phone technology". *BMC Infect Dis* 13: 1-10.
- PINARDI ME, SANTAELLA C. (1994). "Pruebas intradérmicas y baciloscopia en el diagnóstico de lepra". *Dermatol Venez* 32(4):165-166.
- QIONG-HUA P, ZHONG-YI Z, JUN Y, YAN W, LIAN-CHAO Y, HUAN-YING L, REED SG, DUTHIE MS. (2013). "Early Revelation of Leprosy in China by Sequential Antibody Analyses with LID-1 and PGL-I". *J Trop Med.* 2013:352689.
- RADA EM, CONVIT J, ULRICH M, GALLINOTO ME, ARANZAZU N. (1987). "Immunosuppression and cellular immunity reactions in leprosy patients treated with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG". *Int J Lepr* 55(4): 646-650.
- RADA E, SANTAELLA C, ARANZAZU N, CONVIT J. (1991). "Preliminary study of cellular immunity to *Mycobacterium leprae* protein in contacts and leprosy patients". *Int J Lepr* 60 (2): 189-194.
- RADA E, ULRICH M, ARANZAZU N, SANTAELLA C, et al. (1994). "A longitudinal study of immunologic reactivity in leprosy patients treated with immunotherapy". *Int J Lepr* 62 (4): 552-558.
- RADA E, ULRICH M, ARANZAZU N, RODRIGUEZ V, et al. (1997a). "A follow-up study of multibacillary Hansen's disease patients treated with multidrug therapy (MDT) or MDT + Immunotherapy (IMT)". *Int J Lepr* 65(3): 320-327.
- RADA E, ARANZAZU N, CONVIT J. (1997b). "Immunological reaction to mycobacterial proteins in the spectrum of leprosy". *Int J Lepr* 65 (4): 497-500.
- RADA E, DUTHIE MS, REED SG, ARANZAZU N, CONVIT J, (2012). "Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 90-94.
- RADA SCHLAEFLI E, MESTRE M, ARANZAZU N, MORALES J, SOSA R, GUEVARA JR. (2019). "Respuesta serológica frente a marcadores micobacterianos en una zona hiperendémica de lepra. Venezuela (Años 2008-2011)". *Dermatol Venez* 57(1): 41-50.
- REECE ST, IRETON G, MOHAMATH R, GUDERIAN J, GOTO W, et al. (2006). "ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potencial for diagnosis of leprosy. *Clin and Vacc Immunol* 13: 333-340.
- RIDLEY DS, JOPLING WH. (1966). "Classification of leprosy according to immunity; a five group system". *Int J Lepr* 34(3):255-273.
- RIVOIRE BL, TERLOUW S, GROATHOUSE NA, BRENNAN PJ. (2014). "The challenge of producing skin test antigens with minimal resources suitable for human application against a neglected tropical disease; leprosy". *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):1-12.
- RIVOIRE BL, GROATHOUSE NA, TERLOUW S, NEUPANE KD, et al. (2014). "Safety and efficacy assessment of two new leprosy skin test antigens: randomized double blind clinical study" *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):1-14.
- SPENCER JS, DUTHIE MS, GELUK A, BALAGON MF, KIM HJ, et al. (2012). "Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:79-89.
- STEFANI MM. (2008). "Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis". *Rev Soc Bras Med Trop* 41(2): 89-94.
- ULRICH M, CONVIT J, CENTENO M, RADA E. (1986). "Caracterización parcial y evaluación de la activación inmunológica de antígenos solubles de *Mycobacterium leprae*". *Inmunología Clínica, UCV*, p 455-462.
- ULRICH M, SMITH PG, SAMPSON C, ZUNIGA M, et al. (1991). "IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela. Epidemiological observations and prospective study of the risk of leprosy". *Int J Lepr* 59: 405-415.
- VAN HOOIJ A, TION KON FAT EM, RICHARDUS R, VAN DEN EEDEN SJ, et al. (2016). "Quantitative lateral flow strip

assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy" *Sci Rep* 29(6): 1-10.

VAN HOOIJ A, TJON KON FAT EM, BATISTA DA SILVA M, CARVALHO BOUTH R, et al. (2018). "Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia". *Sci Rep* 8(1): 1-9.

VAN HOOIJ A, VAN DEN EEDEN S, RICHARDUS R, TJON KON FAT E, et al. (2019). "Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field". *EBioMedicine* 47:301-308.

VISSA VD, BRENNAN PJ. (2001). "The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set". *Gen Biol* 2(8):1-8.

WHO. (2000). "Guide to elimination of leprosy as a public health problem. 1st Ed. Geneva.

WHO. (2018). "Directrices para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la lepra". p. 1-89. [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/guidelines-diagnosis-treatment-and-prevention-leprosy>.

# Melinis minutiflora (Capim Melao), una gramínea de importancia alérgica en Venezuela

Franca Puccio<sup>1,2</sup>

puccio.franca@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-3619-6976>

Domenico Cifarelli<sup>1</sup>

Elianska Lopez<sup>1</sup>

eliellopez@gmail.com

Isabel Hagel<sup>1</sup>

isabelhagel@gmail.com

Maria C. Di Prisco<sup>1</sup>

mariacristinadi@gmail.com

Francesc Castejon<sup>1</sup>

casteg65@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

El polen de las gramíneas figura como una de las causas más importante de polinosis a nivel mundial. En Venezuela son pocos los reportes de reacciones alérgicas a gramíneas. No obstante, entre los meses de noviembre a marzo se registra un aumento en la incidencia de las patologías alérgicas en varias ciudades del país, particularmente en Caracas. Las investigaciones sobre la sensibilización a esta gramínea han sido limitadas y hasta la fecha no existe en el mercado latinoamericano ningún extracto comercial de potencia estandarizada de esta gramínea. Se preparó un extracto de procedencia local siguiendo estándares internacionales, y se evaluó la reactividad alérgica a *Melinis minutiflora* en pacientes alérgicos Venezolanos. Se determinó la toxicidad aguda y crónica en un modelo murino y se evaluaron 608 pacientes de la Consulta de Alergia del Instituto de Biomedicina. No hubo toxicidad aguda ni crónica en el modelo murino. *Melinis minutiflora* presentó una positividad de 22,6 % en los pacientes evaluados. Se reporta una actividad biológica de 48,20UB/ml. Existió un porcentaje importante de positividad en prueba cutánea al extracto de *Melinis minutiflora* (Capim melao), mayor que a un extracto comercial de otras gramíneas que no incluyen a Capim melao (pólenes IV). Un importante número de pacientes reaccionan exclusivamente a Capim melao en pruebas cutáneas. Nuestros resultados sugieren la importancia de incorporar de rutina a la batería de alérgenos que se usa para la evaluación de pacientes alérgicos, a extractos localmente producidos como el de *Melinis minutiflora* que podría ser el responsable de un porcentaje importante de cuadros alérgicos en diferentes poblaciones.

**Palabras clave:** *Melinis minutiflora*; alergia; pruebas cutáneas; gramíneas.

## **Melinis minutiflora (Capim Melao) A GRAMMINE OF ALLERGENIC IMPORTANCE IN VENEZUELA**

### ABSTRACT

Grass pollen is one of the most important causes of pollinosis worldwide. In Venezuela, there are few reports of allergic reactions to grasses. However, between the months of November to March there is an increase in the incidence of allergic

pathologies in several cities in the country, particularly in Caracas. Research on sensitization to this grass has been limited and to date there is no commercial extract of standardized potency of this grass in the Latin American market. An extract of local origin was prepared following international standards, and allergic reactivity to *Melinis minutiflora* (Capim melao) was evaluated in Venezuelan allergic patients. Acute and chronic toxicity were determined in a murine model and 608 patients from the Allergy Consultation of the Institute of Biomedicine were evaluated. There was no acute or chronic toxicity in the murine model. *Melinis minutiflora* presented a positivity of 22.6% in the evaluated patients. A biological activity of 48.20UB / ml is reported. There was a significant percentage of skin test positivity to the extract of *Melinis minutiflora*, higher than to a commercial extract of other grasses that do not include Capim melao (pollens IV). A significant number of patients react exclusively to Capim melao in skin prick tests. Our results suggest the importance of routinely incorporating locally produced extracts such as *Melinis minutiflora* into the allergen battery used for the evaluation of allergic patients, which could be responsible for a significant percentage of allergic conditions in different populations

**Keywords:** *Melinis minutiflora*; allergy; skin prick test; grass.

## INTRODUCCIÓN

Las gramíneas han sido objeto de extensos estudios en los últimos años y debido a la gran alergenicidad de sus pólenes y a su extensa distribución vegetal, han demostrado ser una de las causas más importante de polinosis a nivel mundial (Subiza, 2003). Las especies *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Cynodon dactylon*, *Bromus catharticus*, *Dactylis glomerata* y *Festuca pratensis*, se encuentran entre las principales gramíneas causales de alergia en los continentes americanos y europeo (Anderson, 2003). En Venezuela, la familia de las Poaceae se encuentra representada por cerca de 111 géneros y 549 especies de gramíneas (Huber *et al.*, 1998). *Melinis minutiflora* (Capim melao), es una gramínea nativa del África, introducida primero a Brasil y posteriormente a Venezuela (Mondolfi, 1957). Pertenece a la Familia: Poaceae, Subfamilia: Panicoideae, Tribu:

*Paniceae*, Género: *Melinis*, Especie: *Melinis minutiflora*. Nombre: *Melinis minutiflora* P Beauv. (Baruch, 1985). Esta gramínea florece entre noviembre a marzo en diversas partes de Venezuela (Hurtado y Riegler-Goihman, 1984; Perdomo-Ponce *et al.*, 1991).

Se encuentra distribuida en varias zonas a nivel mundial. No obstante, las manifestaciones alérgicas a esta gramínea no han sido muy estudiadas. El Dr Benaim Pinto en 1960 reporta un 17% de positividad en pruebas alérgicas cutáneas frente al extracto de esta gramínea, y una prevalencia del 40% en un grupo pequeño de pacientes con alergia respiratoria (Pinto, 1960). Posteriormente, la Dra Perdomo de Ponce y col, (1991) elaboraron el primer calendario polínico de la ciudad de Caracas y confirman la presencia y los períodos de floración de *Melinis minutiflora* (Capim melao), como la principal gramínea en el valle caraqueño, con picos de floración entre octubre y marzo (Perdomo de Ponce *et al.*, 1991). Nuestro grupo en el 2009, realizó el primer estudio preliminar de evaluación de la reactividad alérgica frente a *Melinis minutiflora* en niños alérgicos. No obstante, hasta la fecha no se ha incorporado este antígeno en la rutina de evaluación, que incluye la realización de pruebas cutáneas y la detección de IgE específica, del paciente alérgico venezolano ni de Latinoamérica.

Tampoco ha sido determinado su papel en la exacerbación de diferentes enfermedades alérgicas durante su floración. En este estudio se preparó un extracto local, estandarizado de polen de *Melinis minutiflora*, se determinó su toxicidad aguda y crónica en modelo murino, y se evaluó su actividad biológica así como la reactividad cutánea en 608 pacientes alérgicos venezolanos y se estableció la comparación de la reactividad cutánea con un extracto de gramíneas que se usa de forma comercial, pero que no incluye a Capim melao en su composición.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del extracto local de *Melinis minutiflora* (Capim melao)

La gramínea se recogió durante el periodo de máxima floración, octubre a enero (2008-2012) en

lugares distantes de caminos y carreteras, de acuerdo a las sugerencias descritas previamente (Pinto, 1960). Cada tallo fue desprovisto de sus hojas y colocado en envases de agua, hasta que se desprendieron los granos de polen que se colocaron en un desecador con gel de sílica para evitar la hidratación del polen. Se purificó el polen, eliminando los desechos más gruesos como pelos y restos de antenas, pasándolo a través de un tamiz de acero inoxidable con poros no mayores a 40 micras, y se clasificó como "puro", cuando no contenía más de 0,5-1% de partículas extrañas. Internacionalmente, se acepta un nivel de contaminación del polen del 1%. (Codina *et al.*, 2016; Nazila *et al.*, 2018). Los gránulos purificados se conservaron permanentemente en desecador.

La extracción proteica se realizó como se ha descrito previamente (Puccio *et al.*, 2004), agregando 200ml de la solución extractora de proteínas de Bicarbonato de Amonio 0.05M pH=8.0 por 10grs de *Melinis minutiflora* (Capim melao) en agitación por 48 horas a 4 °C. Posteriormente, se filtró por 0.45 y 0.22 um y se dializó por 48 horas con solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85%. Se liofilizó en los envases correspondientes utilizando un liofilizador comercial FreeZone 4.5 Liter Freeze Dry Systems (Labconco) según el protocolo descrito por la casa comercial. Al producto liofilizado se le realizó extracción lipídica mediante precipitación con metanol/cloroformo (Wessel *et al.*, 1989). Finalmente el *pellet* de proteínas fue resuspendido en buffer fosfato salino (PBS) y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

Se determinó la concentración de proteínas con el método de Bradford, y luego se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida Se dializó y filtró en condiciones de esterilidad y luego se determinó la toxicidad aguda y crónica del extracto al ser inyectado en ratones de experimentación para posteriormente preparar el extracto para la aplicación en pruebas de piel en el grupo de estudio de acuerdo a estándares internacionales de preparación de extractos alérgicos.

Los ratones fueron suministrados y mantenidos por el Bioterio del Instituto de Biomedicina y se siguieron las normas éticas de experimentación en

animales. Se evaluó la toxicidad aguda del extracto Capim melao a 10.000 PNU/mL (200 UI/mL), ya que la dosis recomendada de preparaciones alérgicas para diagnóstico para animales de experimentación deberá situarse en el rango mayor de la aceptada para humanos, en 10 ratones de la cepa NMRI y 5 controles, a los cuales se les aplicó solo la solución diluyente del extracto en condiciones de esterilidad. Se controló el peso de los animales al inicio y fin del experimento como parámetro demostrativo de toxicidad, considerándolo positivo si la pérdida de peso excediere al 10% del peso vivo inicial del animal.

### **Toxicidad aguda**

Se midió la extravasación de plasma (hemoconcentración) provocada en la cepa de ratones NMRI por la inyección por vía intraperitoneal de 0.2 mL del extracto (0.6 mg/mL), modificación de protocolo de Iff y Vaz, (1966). Determinando el porcentaje de hemoconcentración en muestras de 10 ul de sangre extraída de la cola antes y 10, 20 minutos después de la inyección del extracto. Para esto, las muestras de sangre fueron diluidas en 5 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.1 % y se midió la densidad óptica a 541 nm. Al grupo control se le inyectó solución salina 0.2 mL. El porcentaje de hemoconcentración se determinó al evaluar la DO antes y después de la inyección del extracto alérgico.

### **Toxicidad crónica**

Se inyectó vía intraperitoneal 0.2 mL del extracto (0.6 mg/mL). Se observaron los animales por un período de 7 días y se controló el peso corporal al inicio y fin del ensayo. Al concluir el experimento se sacrificaron todos los animales para estudios anatomopatológicos macroscópico e histológicos en el bazo, pulmón é hígado. Se fijaron los órganos en 10 % formol y luego se prepararon cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina-eosina para examinarlos al microscopio.

## Preparación del extracto de *Melinis minutiflora* (Capim melao) para pruebas de piel (Prick test).

Posterior al control microbiológico y micológico, el extracto se filtró por 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) en condiciones de esterilidad y se utilizó a 0.109 mg/mL en solución diluyente (50% solución fisiológica fenolada al 0,04% y 50% de glicerina).

## Determinación de la actividad biológica del extracto.

Se determinó la actividad biológica en un grupo de 30 pacientes que asistieron para su control a la Consulta de alergia del Instituto de Biomedicina. Previo Firma del Consentimiento informado para pacientes. Se calculo la potencia alergénica al calcular que una dilución de un extracto tiene una potencia de 100UB/mL cuando, al realizar una prueba por punción en 30 sujetos clínicamente sensibles, se produce un promedio de pápula de 8,6 mm. Basándonos en que: una dilución de un extracto tiene una potencia de 100 UB/mL cuando, al realizar una prueba por punción en 30 sujetos clínicamente sensibles, se produce una media geométrica de pápula de 75 mm<sup>2</sup> (promedio de pápula de 8,6 mm), se calculó la actividad biológica.

## Población de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal en un grupo no seleccionado de pacientes alérgicos que asistieron para su control a la consulta de alergia del Instituto de Biomedicina (2008-2014). Este estudio fue previamente aprobado por el comité de bioética del Instituto de Biomedicina (2008). Teniendo en cuenta que la población adulta alcanza la cifra de 22500000, con una prevalencia estimada de alergia de 30%, considerando un error estimado de 5% y un nivel de confianza del 95% se necesitaría evaluar una población de 325 individuos. Se incluyó un grupo de 608 pacientes previa firma del consentimiento informado. Se evaluó la reactividad alérgica en prueba cutánea, frente a algunos alérgenos comunes usados de forma rutinaria, incluidos ácaros, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica* y un extracto comercial de una mezcla de pólenes de gramíneas (ALK-Abelló) que no contienen a *Melinis minutiflora* (Capim melao) y que contiene las gramíneas *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium*

y *Phleum* (ALK), así como el extracto de *Melinis minutiflora* localmente producido.

## RESULTADOS

### Características del extracto local de *Melinis minutiflora* (Capim melao)

Se obtuvo un total de 26,0 gramos de polen de Capim melao, con un rendimiento de 38,2%; y una concentración de proteínas de 2,30 mg/mL. Los controles microbiológicos y micológicos del extracto no evidenciaron contaminación del mismo. La electroforésis evidencio bandas de pesos moleculares aproximados: 166 kDa, 115 kDa, 85 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 27 kDa y 19 kDa.

En los ratones inyectados con el extracto y en el grupo control, los valores del porcentaje de variación de la hemoconcentración pre y post inyección del extracto indicaron que no hubo toxicidad aguda, y 24 horas después de ser inyectados los ratones, estos no presentaron ningún tipo de alteración en los porcentajes de hemoconcentración.

Los estudios de toxicidad crónica demostraron que no hubo variación en el peso de los ratones ni cambios histológicos en los órganos evaluados después de la inyección del extracto al compararlos con el grupo control.

### Estudio de la actividad alergénica del extracto de *Melinis minutiflora* (Capim melao) mediante la realización de pruebas cutáneas (Prick test). Evaluación de su actividad biológica

En el grupo de 30 pacientes, el extracto de *Melinis minutiflora* (Capim melao) tuvo una actividad biológica de 48,20 UB/ml. Los porcentajes de positividad en las pruebas cutáneas en los 608 pacientes de la Consulta Externa de Alergia del Instituto de Biomedicina, fueron: *D. pterossynissinus* 60%, *D. farinae* 56,41%, *Blomia tropicalis* 60,89%, *Anisakis simplex* 17,31%, *Blatella germanica* 44,23%, *Periplaneta americana* 40%.

**Tabla 1.** Comparación de la positividad en prueba cutánea entre el polen comercial Polen IV y el extracto de *Melinis minutiflora* en los pacientes alérgicos.

	Pacientes positivos en prueba cutánea <i>Melinis minutiflora</i> N	Pacientes negativos en prueba cutánea <i>Melinis minutiflora</i> N	Total Pacientes
Pacientes positivos en prueba cutánea Polen IV	46	33	79
Pacientes negativos en prueba cutánea Polen IV	88	441	529
Total	134	474	608

Chi<sup>2</sup> 69.205. Valor de p<0.00001. Estadísticamente significativo con un nivel de significación del 95%. Se observa un número significativo de pacientes positivos en pruebas cutáneas al Capim melao y negativos al extracto comercial de gramíneas.

La prevalencia de sensibilización a los pólenes comerciales Polen IV (*Dactylis*, *Festuca*, *Lolium* y *Phleum*) fue de 12,99%, y el porcentaje de positividad obtenido frente al polen de *Melinis minutiflora* (Capim melao) fue del 22,03%.

El promedio del tamaño de las pápulas de los pacientes a la mezcla de pólenes IV fue de 3,2mm, mientras que el promedio de la pápula al extracto de Capim melao fue de 5,8mm. En la tabla 1 se muestra que existió diferencias estadísticamente significativas p<0,001 en la positividad en pruebas cutáneas entre el extracto comercial de pólenes IV y el de Capim melao. Siendo mayo para *Mellinis minutiflora*, cabe destacar también la especificidad del extracto, ya que existe un importante grupo de pacientes que reaccionan específicamente a Capim y no a pólenes IV.

## DISCUSION

En Venezuela, son escasos los trabajos que reportan el papel de las diferentes gramíneas en el desarrollo de la patología alérgica. No obstante se ha reportado un incremento de las consultas de alergia durante los meses de octubre a marzo, meses que coinciden con los picos de floración de *Mellinis minutiflora* (Capriles Hulett *et al.*, 2005). En el Distrito Capital, *Melinis minutiflora* (Capim melao) se encuentra de manera preponderante en el Parque Nacional el Ávila (Waraira Repano), ubicado en el área Centro-Norte de Venezuela, dentro del tramo central de la Cordillera de la Costa. Este se ubica a lo largo del Distrito Capital (paralelo a la costa) y en la región noroeste del Estado Miranda (Amend, 1991). En el Distrito Federal *Mellinis minutiflora* aparece generalmente a principios del mes de octubre y con las variaciones en los periodos de lluvia y sequia, la floración se puede extender hasta los meses de febrero a marzo (Ponce Perdomo, 1991).

Comenzamos inicialmente por recolectar la materia prima, extraer el polen de *Mellinis minutiflora* y preparar un extracto venezolano al que se le reporta actividad biológica de acuerdo a estándares internacionales. Los procesos de purificación y extracción permitieron elaborar un extracto local que fue utilizado para llevar a cabo un adecuado diagnóstico tanto *in vivo* como *in vitro*. El componente alérgico de los pólenes de las gramíneas se atribuye a una cantidad reducida de proteínas que se liberan rápidamente del grano de polen al hidratarse por contacto con las mucosas (Andersson y Lidholm, 2003). Los alérgenos identificados presentan propiedades fisicoquímicas e inmunológicas similares. Actualmente se han descrito 11 grupos de alérgenos en poaceas (D'Amato *et al.*, 1991). Las bandas encontradas en la electroforesis podrían relacionarse con los alérgenos de los grupos 1 (27 kDa), 2 (20 kDa), 4 (50kDa) y 5 (36 kDa). Estos han sido descritos previamente como alérgenos principales de algunas gramíneas (Weebwe, 2003). Valdría la pena evaluar la reactividad cruzada con otras especies de gramíneas y determinar el porcentaje de homología entre sus

proteínas. El valor de actividad biológica obtenido en el extracto de *Melinis minutiflora* (Capim melao), fue de 48,20 UB/ml, demostrando una alta capacidad de inducir reconocimiento en prueba cutánea de los pacientes alérgicos venezolanos.

Este extracto fue presentado para la patente de registro ante el ministerio del poder popular para el comercio en el servicio autónomo de propiedad intelectual número 01422909.

No obstante, dado que hasta el momento, son escasas las investigaciones sobre el papel que ejerce *Melinis minutiflora* (Capim melao) en el desarrollo y exacerbación de la patología alérgica, nos propusimos investigar inicialmente cual era la prevalencia de la sensibilización en pruebas cutáneas, que son el parámetro Gold estándar de evaluación de los pacientes alérgicos, frente a esta gramínea y comparar con otros pólenes comerciales que no tienen a *Mellinis* dentro de su composición y que se emplean de forma rutinaria. Por esta razón incluimos el extracto comercial pólenes IV de la compañía española ALK bello y nuestro extracto localmente producido de *Melinis minutiflora* (Capim melao), en un grupo de 608 pacientes que acudieron a la Consulta de Alergia del Instituto de Biomedicina. Al determinar la prevalencia de sensibilización utilizando los pólenes comerciales que contiene las gramíneas *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium* y *Phleum*, (ALK), se encontró un menor porcentaje de positividad comparado con nuestro extracto local. La positividad frente a *Mellinis minutiflora* se ubicó en 22,03 % de sensibilización en una población de pacientes que acuden a la consulta de alergia, con un promedio de pápulas de los pacientes de 5,8 mm y superior al reportado en 1960 (Pinto, 1960). Adicionalmente evidenciamos un grupo importante de pacientes que reaccionan solamente al extracto de *Melinis minutiflora* y no al de otras gramíneas, reforzando la idea de una reactividad específica de los mismos a esta especie.

Considerando que actualmente no se cuenta con un extracto comercial de esta gramínea que se aplique de forma rutinaria, y que esta tiene una amplia distribución a nivel mundial, se recomienda anexar el extracto alérgico de *Melinis minutiflora* (Capim

melao), a la batería de extractos alérgicos para evaluar a los pacientes alérgicos. De igual forma, se sugiere continuar con nuevas investigaciones que permitan en un futuro cercano, utilizar extractos de esta gramínea para elaborar vacunas que sean usadas en la IT en los individuos atópicos, lo cual mejoraría la calidad de vida de estos pacientes.

## REFERENCIAS

- AMEND S. (1991). "Parque Nacional El Ávila. Serie Parques Nacionales y Conservación Ambiental N° 2". Stephan y Thora Amend Eds.
- ANDERSSON K., LIDHOLM J. (2003). "Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens". *Int Arch Allergy Immunol* 130:87-107.
- BAENA-CAGNANI C.E., PATIÑO C.M., CUELLO M.N., MINERVINI M.C., FERNÁNDEZ A.M., GARIP E.A., SALVUCCI K.D., SANCHO M.L., CORELLI S., GÓMEZ R.M. (1999). "Prevalence and severity of asthma and wheezing in an Adolescent population". *Int Arch Allergy Immunol* 118:245-246.
- BARUCH Z., LUDLOW M.M., DAVIS R. (1985). "Photosynthetic responses of native and introduced C<sub>4</sub> grasses from Venezuelan savannas". *Oecologia* 67(3):388-393.
- BENAIM PINTO C., (1972). "Pollen of *Melinis minutiflora* Beauv. (Capim melao): biological air pollutant with possible implication in the etiology of respiratory allergy (preliminary report)". *Acta Cient Venez* 23(4):155-6.
- CAPRILES HULETT A., GIANNONI DELGADO L., CAPRILES BEHRENS E. (2005). "El por qué del incremento del asma y las alergias en Venezuela en los últimos 25 años". *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* 64: 37-41.
- CODINA R., LOCKEY R.F. (2016). "Pollen Used to Produce Allergen Extracts". *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016, 30(1).
- D'AMATO SPIEKSMAN F.T.H.M., BONINI S. (1991) "Allergenic pollen and pollinosis in Europe. London". Blackwell scientific Publications 62(9):976-990.
- FABIANO F., PUCCIO F. (2009). "Reactividad alérgica a *Melinis minutiflora* (Capim melão) en niños escolares

- venezolanos". Tesis de especialización. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 144pp.
- HUBER O.R., DUNO R., RIINA F., STAUFFER L., PAPPATERRA A., JIMÉNEZ S., ORSINI G., (1998). "Estado Actual del Conocimiento de la Flora en Venezuela". Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables (MARNR). Fundación Instituto Botánico de Venezuela (FIBV). Caracas, Venezuela. 153 pp.
- HURTADO I., RIEGLER-GOIHMAN M., (1984). "Air sampling studies in tropical America (Venezuela): Frequency and periodicity of pollen and spores". *Allergol et Immunopath* 12:449-454.
- IFF E.T, VAZ N.M. (1996). "Mechanisms of anaphylaxis in the mouse". *Int Arch Allergy Appl Immunol* 30:313.
- JUTEL M., AGACHE I., BONINI S., BURKS A.W., CALDERON M., CANONICA W., COX L., DEMOLY P., FREW A.J., O'HEHIR R. (2016). "International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, Standardization, and Pharmacoeconomics". *J Allergy Clin Immunol* 137(2):358-368.
- MONDOLFI E., (1956). "Capim Melao o pasto gordura". *Extensión Pecuaria. Publicación Serie C. Ministerio de Agricultura y Cría. Dirección de Ganadería. Caracas, Venezuela.*
- MONTEAGUDO JIMÉNE E., MONTEAGUDO L., DÍAZ COSTA L. (2000). "Estudio de Toxicidad Aguda del Extracto Alérgico de *Helminthosporium* sp. en Ratas y Ratones". *Acta Farm Bonaerense* 19(2):125-8.
- NAZILA A., ABDOLREZA V., FARAHZAD J.A., MOJTABA S. (2018). "Preparation allergenic pollen extracts; the points should be considered to make high-quality". *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 40(1):26-39.
- PERDOMO DE PONCE D., SALGADO M., HERNÁNDEZ A., ALVAREZ F., RULL V., GUARIGLIA M., BOLBOCHÁN D., SUÁREZ V. (1991). "Common Airborne Allergens and their clinical relevance in the Caracas valley". *Invest Clin* 32:157-186.
- PUCCIO F.A., LYNCH N.R., NOYA O., NODA A., HAGEL I., LÓPEZ E., LÓPEZ R., CARABALLO L., MERCADO D., DIPRISCO M.C. (2004). "Importance of including *Blomia tropicalis* in the routine diagnosis of Venezuelan patients with persistent allergic symptoms". *Allergy* 59:753-757.
- SUBIZA J., (2003). "Gramíneas: Aerobiología y polinosis en España". *Alergol Inmunol Clin* 18:7-9.
- SUBIZA E., SUBIZA J., JEREZ M. (1989). "Aerobiología de las gramíneas en los climas de España". *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 4:45-50.
- WEBER R.W. (2003). "Patterns of pollen cross-allergenicity". *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112(2):229-239.
- WESSEL D., FLUEGGE UI. (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids". *Anal Biochem* 138:141-143.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del personal del Laboratorio de Inmunopatología del Instituto de Biomedicina en especial a la Sra. Trina Amundaray, la TSU Emperatriz Mata, al técnico de laboratorio Nelson Vazquez y a la licenciada María Elena Roque por su colaboración con el manejo de los pacientes de la Consulta de alergia. A los estudiantes de pregrado de Biología y especialización de inmunología clínica de laboratorio, UCV. Al Ingeniero Luis Castejón por su colaboración para la recolección y selección de la gramínea. Al fonacit por el financiamiento en el marco del proyecto 20122001253.

# Asociación entre factores inmunológicos presentes en la leche materna y el desarrollo de dermatitis atópica en lactantes

**Ingrid Rivera<sup>1</sup>**  
draingridderma@gmail.com

**María Mercedes Hernández<sup>1</sup>**  
hernanurb@gmail.com

**Zulay Rivera<sup>1</sup>**  
drazulayderma@gmail.com

**María Cristina Di Prisco<sup>1</sup>**  
mariacristinadi@gmail.com

**Dennis A. Lugo<sup>1</sup>**  
deallugo@gmail.com

**Maira Cabrera<sup>1</sup>**  
mairacab@gmail.com

**Isabel Hagel<sup>1</sup>**  
isabelhagel@gmail.com  
<http://orcid.org/0000-0003-4464-1830>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la asociación entre la presencia de distintas citocinas y anticuerpos en la leche materna con el desarrollo de signos y síntomas de dermatitis atópica en lactantes. Se realizó estudio descriptivo, transversal, de casos y controles, evaluación clínica dermatológica (Hannifin y Rajka/SCORAD) en los lactantes, así como la determinación de citocinas y anticuerpos en muestras de leche materna (IgA, IgE, sCD23, IL-10, sCD14, IL-13, TGF- $\beta$  (ELISA)). La severidad de la dermatitis atópica (SCORAD) fue mayor en lactantes de menor edad. Encontramos una fuerte asociación negativa entre los niveles de IgA secretora, los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$  en las muestras de leche materna con la severidad de la dermatitis atópica. En cambio, se observó una asociación positiva entre la presencia de IgE, IL-13 y sCD23 en la leche materna con el desarrollo de DA en lactantes. Así el perfil "pro-atópico" de madres durante la lactancia caracterizado por elevados niveles de IgE total, IL-13 y sCD23 en la leche materna podría favorecer el desarrollo de dermatitis atópica en los lactantes. Al contrario, la presencia de elevados niveles de IgA secretora y citocinas reguladoras como la IL-10 y TGF- $\beta$  protegen frente al desarrollo de esta patología.

**Palabras Clave:** Dermatitis atópica; Lactantes; Leche materna; IgA; IgE; Citocinas.

## ASSOCIATION BETWEEN IMMUNOLOGICAL FACTORS PRESENT IN BREAST MILK AND THE DEVELOPMENT OF ATOPIC DERMATITIS IN INFANTS

### ABSTRACT

The association of different breast milk cytokines and the development of clinical signs and symptoms of atopic dermatitis in infants was studied. A cross-sectional study of cases and controls was carried out. A clinical dermatological evaluation was performed (Hannifin y Rajka/SCORAD) in the infants, as well as the determination of cytokines and antibodies in breast milk (IgA, IgE, sCD23, IL-10, sCD14, IL-13, TGF- $\beta$  (ELISA)). The severity of atopic dermatitis (SCORAD) was higher in younger infants. A strong negative association between levels of secretory IgA, levels of IL-10 and TGF- $\beta$  in breast milk with the severity of atopic dermatitis was found. In contrast it was observed a positive association between the presence of IgE, IL-13 and sCD23 in breast milk

samples with the development of DA in infants. Thereby a “pro-atopic” profile of lactating mothers characterized by high levels of total IgE, IL-13 and sCD23 in breast milk could favor the development of atopic dermatitis in infants. On the contrary, the presence of high levels of secretory IgA and regulatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  protect against the development of this pathology.

**Keywords:** Atopic dermatitis; Infants; Breast milk cytokines; IgA; IgE.

## INTRODUCCIÓN

La dermatitis atópica (DA) es un proceso inflamatorio de la piel que comienza habitualmente en la infancia. Se caracteriza por prurito intenso, lesiones con morfología y distribución característica, curso crónico y recidivante. Se inicia en un 85% en los primeros 5 años de vida. La mayoría de los casos se resuelven antes de los 2 años de edad o mejoran en la pubertad (Page *et al.*, 2016). Actualmente hay cerca de 10 millones de personas afectadas, encontrándose en más del 10% de los niños con edad promedio de 7 años (Pols *et al.*, 2016). En Venezuela se han descrito prevalencias muy elevadas de DA en niños de poblaciones urbanas (Rivera *et al.*, 2015) y rurales (Hagel *et al.*, 2014).

El desarrollo y severidad de la DA depende de la interrelación entre factores ambientales e intrínsecos al individuo tales como la susceptibilidad genética, defectos en la barrera cutánea y alteraciones de la respuesta inmune (Pols *et al.*, 2016). Las enfermedades atópicas incluyendo la DA, presentan una respuesta inmune tipo Th2 incluyendo la producción preferencial de citocinas pro inflamatorias como IL-13, IL-4, elevados niveles de Eosinofilia (Brandt, 2011), aumento en los niveles del receptor soluble para la IgE tipo2 (sCD23) (Pène *et al.*, 1988) y elevada producción de IgE frente a alérgenos involucrados en los procesos de sensibilización alérgica (Brandt, 2011; Heeringa *et al.*, 2018). Las citocinas con perfil Th2 pueden tener un fuerte impacto en la respuesta inmune de la piel y la función de la barrera cutánea. Existen evidencias de que tanto IL-4 como IL-13 disminuyen significativamente la expresión de genes para proteínas estructurales clave como filagrina, queratina, hornerina, desmogleína y desmocolina entre otras. También alteran la composición lipídica contribuyendo así al aumento de la pérdida de agua transepidérmica (Bieber, 2020). Además, tanto la IL-4

como la IL-13 disminuyen la producción de péptidos antimicrobianos en los queratinocitos (Clausen *et al.*, 2016) y por lo tanto juegan un papel en la disbiosis de la piel caracterizada típicamente por una fuerte colonización con *Staphylococcus aureus*, empeorando las lesiones de DA (Nakatsuji *et al.*, 2017). Además, se ha reportado en modelos experimentales *in vitro* que la IL-13 regula negativamente la expresión de MMP-13 en fibroblastos dérmicos humanos disminuyendo así la degradación del colágeno, lo que resulta en fibrosis con un depósito excesivo de colágeno (Bieber, 2020), característica de la liquenificación, un signo clínico de DA. Otro factor importante en la etiología de la DA es la concurrencia de alergia alimentaria (Cartledge y Chan, 2018; Graham y Eigenmann, 2020; Tsakok *et al.*, 2016), la cual a su vez se asocia fuertemente a la pérdida de la tolerancia frente a macromoléculas derivadas de los alimentos (De Martinis *et al.*, 2020; Fehervari, 2019). En condiciones normales, las células T reguladoras en la mucosa intestinal producen constantemente TGF- $\beta$  el cual estimula selectivamente la producción de anticuerpos IgA (Satitsuksanoa *et al.*, 2018). La IgA contribuye a la eliminación de macromoléculas pro-alérgicas por medio de mecanismos de exclusión (Cerutti y Rescigno, 2008) evitando así la sensibilización frente a alérgenos alimentarios y el consecuente desarrollo de DA. Además, citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 pueden inhibir procesos inflamatorios mediados por IL-13 e IL-4 reduciendo las manifestaciones cutáneas de atopia (Satitsuksanoa *et al.*, 2018).

Está ampliamente demostrado que la lactancia materna protege de las enfermedades infecciosas y reduce en más de la mitad de la tasa de mortalidad infantil. La Organización Mundial de la Salud recomienda la lactancia materna exclusiva durante 6 meses antes de introducir alimentos sólidos (Dawod y Marshall, 2019). En los últimos 20 años, se han identificado múltiples citocinas y factores inmunomoduladores (lípidos, carbohidratos entre otros) en la leche materna (Berdi *et al.*, 2019; Dawod y Marshall, 2019). Muchos de estos factores se derivan de las células epiteliales de la glándula mamaria o de las células del sistema inmunitario que se encuentran

en la leche, mientras que otros se transfieren de la circulación de la madre (Brandtzaeg, 2010). Estos componentes de la leche materna podrían afectar el desarrollo de la tolerancia oral neonatal a través de mecanismos de modulación inmunológica y ejerciendo influencia sobre la función de barrera epitelial (Barrera y Sánchez, 2016; Figueroa-Lozano y de Vos, 2019) y el microbioma intestinal (Cacho y Lawrence, 2017; Sitarik *et al.*, 2017). Existen evidencias de que TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6 y sCD14 en la leche materna tienen un impacto positivo en el desarrollo de tolerancia frente a antígenos alimentarios (Brandtzaeg, 2010; Dawod y Marshall, 2019). Además, se ha reportado que los niveles de IgA en la leche materna correlacionan positivamente con las concentraciones de TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-6 en la leche materna (Böttcher *et al.*, 1999; Dawod y Marshall, 2019). A su vez, altos niveles de IgA en la leche materna protegen contra el desarrollo de enfermedades alérgicas, incluida la alergia a la proteína de la leche de vaca (Rajani *et al.*, 2018; Seppo *et al.*, 2017). Sin embargo, la condición de atopia en la madre puede influir en el perfil inmunológico de la leche materna. Así, trabajos realizados en muestras de leche materna y calostro han demostrado que los valores de TGF- $\beta_1$  son menores en las muestras de madres atópicas que aquellos medidos en muestras de madres no atópicas (Böttcher *et al.*, 1999; Rigotti *et al.*, 2006). También se han reportado elevados niveles de lactoferrina e IL-17 en muestras de leche materna de madres atópicas comparados con los observados en muestras de madres no atópicas. Más aún se ha reportado una asociación positiva entre los niveles de lactoferrina e IL-17 con el desarrollo de manifestaciones de alergia en los niños de madres atópicas (Polonkai *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta estos hallazgos y la elevada prevalencia de DA en la población infantil venezolana, se realizó un estudio preliminar de las posibles asociaciones entre el perfil de citocinas y anticuerpos presentes en la leche materna y el desarrollo de DA en un grupo de lactantes venezolanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población estudiada.** Se realizó un estudio descriptivo,

transversal, de casos y controles en lactantes (3-12 meses) evaluados en la Consulta de Dermatología pediátrica del Instituto de Biomedicina que acudieron por trastornos dermatológicos. Los casos fueron lactantes con dermatitis atópica y los controles sin dermatitis atópica ni infecciones de piel o que comprometían las mucosas. Todos los niños participantes recibían para el momento de la evaluación lactancia materna. El trabajo fue aprobado por la Comisión de Ética del Instituto de Biomedicina. Los padres o representantes firmaron el consentimiento informado. Fueron excluidos del trabajo lactantes que no recibían lactancia materna (sólo fórmulas de leche artificial) y aquellos cuyas madres padecían algún tipo de enfermedad de etiología inmunológica (vitíligo, dermatitis por contacto, artritis reumatoide, lupus eritematoso, entre otras) o inmunocomprometidas (VIH positivas).

**Evaluación clínica.** Previo llenado y firmado de la hoja de consentimiento informado por cada representante legal del paciente, se procedió a realizar examen físico de la piel, siguiendo los criterios para diagnóstico de DA establecidos por Hannifin y Rajka (Hannifin y Rajka, 1980) y valoración de la severidad según el SCORAD (Oranje *et al.*, 2007). Se verificaron los antecedentes clínicos del niño y de la madre.

**Recolección de las muestras de leche materna.** Las madres de los lactantes exprimieron directamente en un tubo conteniendo inhibidores de proteasas, 3 mL de leche materna. Las muestras luego fueron centrifugadas y el sobrenadante se guardó a  $-10^{\circ}\text{C}$  en tubos Eppendorf conteniendo  $1\mu\text{L}$  de un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich).

**Niveles de anticuerpos y citocinas en leche materna.** La medición de anticuerpos en leche materna se realizó mediante la técnica de ELISA reportada previamente para la medición de anticuerpos en saliva (Ortiz *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2011, 2004). Se utilizó una concentración de  $1\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  para el anticuerpo de captura de IgE (I6510 Sigma Aldrich) y de  $2\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  para el de IgA (I6635 Sigma Aldrich). El anticuerpo conjugado con peroxidasa se utilizó a una dilución de 1:2000 para IgE (A9667 Sigma Aldrich) y 1:3000 para IgA (AO295 Sigma Aldrich). Las muestras de leche

materna se diluyeron 1:2 en ambos casos. En cada ensayo se incluyó una curva de calibración utilizando IgA humana de calostro como estándar (I-1010, Sigma Aldrich) o IgE monoclonal humana (native human IgE protein ab65866, ABCAM). Los resultados fueron expresados en ug/mL. Los valores de sCD14, sCD23, IL-13, IL-10 y TGF-β1 en muestras de leche materna se evaluaron mediante ensayos comerciales (Quantikine, R&D systems) y fueron expresados en pg/mL.

**Análisis estadístico.** Se realizó utilizando el programa GraphPad InStat versión 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico. Se compararon las medianas de los valores de los distintos parámetros empleando la prueba de Kruskal-Wallis. Para establecer las correlaciones entre las variables se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

## RESULTADOS

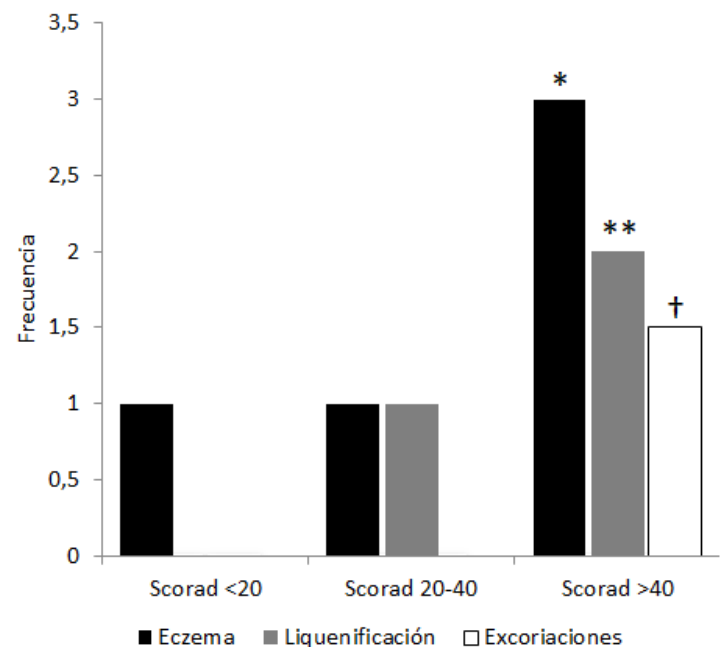
Participaron en este estudio un total de 46 lactantes y sus madres, 18 niños sanos (controles) y 28 niños con DA, que acudieron a la Consulta de Dermatología Pediátrica del Instituto de Biomedicina durante un año. La mediana de edad de los pacientes estudiados fue de 11 meses. Se encontró una asociación significativa inversa ( $p=0,0036$ ) entre el SCORAD de los pacientes y la edad. El género, los antecedentes familiares y el estado nutricional, no tuvieron influencia en el SCORAD (Tabla 1).

Se compararon estadísticamente las medianas de los valores de distintos signos clínicos mediante ANOVA no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) encontrándose una diferencia significativa ( $p<0,005$ ) entre las medianas de los valores de eczema, liquenificación y excoriaciones correspondientes a los grupos de niños con SCORAD<20 y aquellos con SCORAD entre 20-40 o >40 (Figura 1).

La tabla 2 muestra la contribución de cada signo clínico al SCORAD (Correlación de Spearman) en donde se evidencia que el eczema, la liquenificación, y las excoriaciones contribuyeron significativamente al SCORAD ( $p<0,0001$ ). Se encontró una asociación leve con las infecciones secundarias ( $p=0,048$ ). Ningún paciente presentó prurigo.

**Tabla 1.** Asociación entre características de los lactantes y la severidad de la dermatitis atópica (SCORAD), en un grupo de lactantes evaluados en la Consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina.

Parámetro	Spearman r	IC 95%	Valor p (dos colas)
Edad (meses)	-0,4205	-0,6388 a -0,1396	0,0036
Género	-0,2952	-0,5456 a 0,003581	0,0464
Antecedentes familiares	0,1385	-0,1668 a 0,4196	0,3586
Estado Nutricional	-0,1269	-0,4098 a 0,1783	0,4007

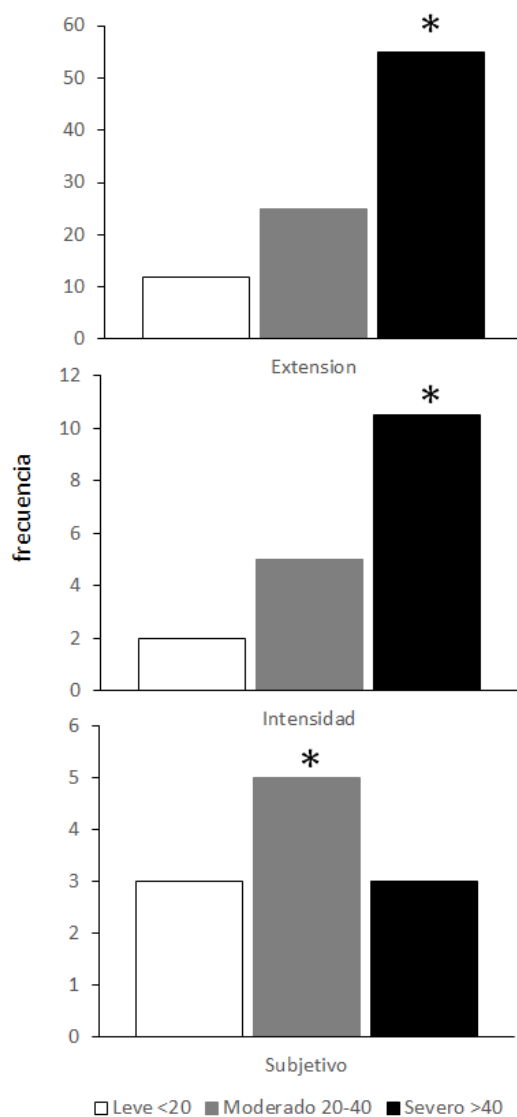


**Figura 1.** Mediana de los valores de SCORAD de acuerdo a la severidad de la dermatitis atópica en un grupo de lactantes evaluados en la Consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina. \* $p<0,005$ ; \*\* $p<0,005$ ; † $p<0,005$  (prueba de Kruskal-Wallis).

En la figura 2 se observa un aumento progresivo acorde con el SCORAD de los componentes Extensión, Intensidad y Subjetivo, siendo las medianas de estos valores significativamente más elevadas ( $p<0,0001$ ) en el grupo con DA severa (Scorad >40) para los componentes Extensión e Intensidad mientras que el componente Subjetivo fue significativamente mayor ( $p<0,005$ ) en los moderados (SCORAD 20-40).

**Tabla 2.** Contribución de los diferentes signos clínicos en la severidad de la dermatitis atópica (SCORAD), en un grupo de lactantes evaluados en la Consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina.

Parámetro	Spearman r	IC 95%	Valor p (dos colas)
Eczema	0,8698	0,7717 a 0,9275	< 0,0001
Prurigo	0,1471	-0,1583 a 0,4268	0,3292
Liquenificación	0,7555	0,5901 a 0,8600	< 0,0001
Infecciones secundarias de piel	0,296	-0,002637 a 0,5462	0,0458
Excoriaciones	0,5048	0,2430 a 0,6981	0,0003



**Figura 2.** Mediana de los valores de los componentes de SCORAD según la severidad de la dermatitis atópica (SCORAD), en un grupo de lactantes evaluados en la Consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina. \* $p < 0,005$  (prueba de Kruskal-Wallis).

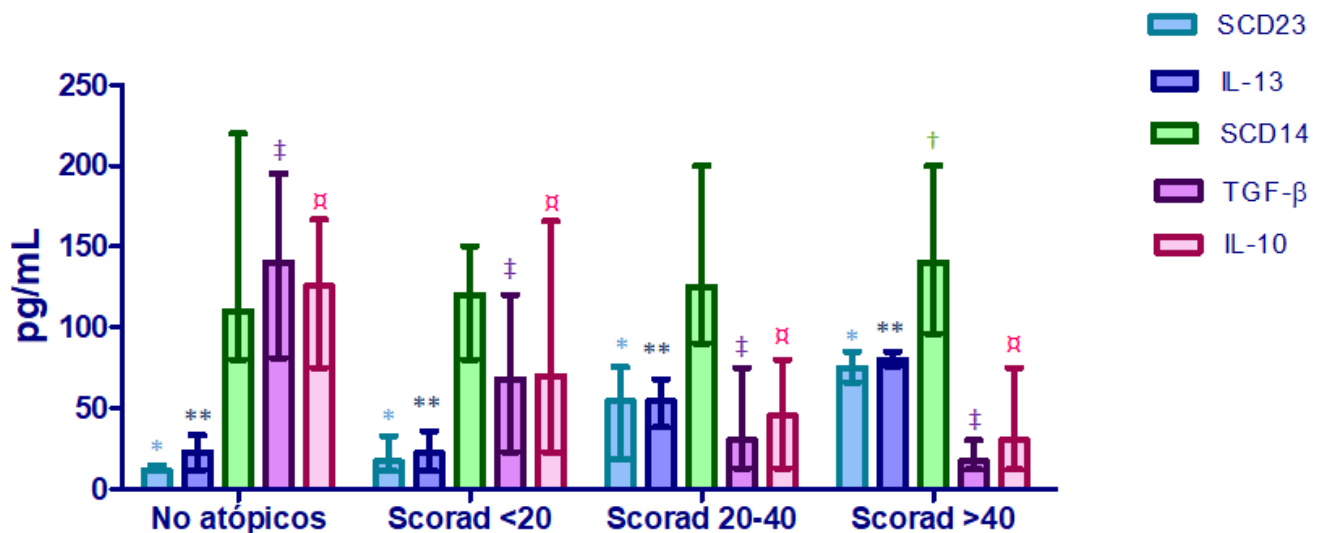
La tabla 3 muestra que los tres componentes (Extensión, Intensidad y Subjetivo) contribuyen similarmente ( $p < 0,0001$ ) al SCORAD.

En la figura 3 se muestra las medianas de los valores de distintas citocinas medidas en leche materna de acuerdo a la presencia y severidad de la DA (SCORAD). Se puede observar que los valores de sCD23 e IL-13 aumentaron progresivamente en forma significativa ( $p < 0,005$ ) acorde a la severidad de la DA. En cambio, los niveles de IL-10 y TGF- $\beta_1$  disminuyen progresivamente con la severidad de la DA siendo más bajos en los niños con DA severa ( $p < 0,0001$ ). Además, se evidencia como los niveles de sCD14 en leche materna fueron comparables en los distintos grupos encontrándose un leve aumento de los valores de esta citocina en los niños con DA severa ( $p < 0,05$ ). Los valores de IgE total fueron significativamente más elevados ( $p < 0,0001$ ) en la leche materna de las madres cuyos lactantes presentaron DA comparados con el grupo control (Figura 4). Sin embargo, las medianas de los valores de IgE en leche materna correspondientes a los grupos con DA moderada (SCORAD: 20-40) y severa (SCORAD >40) fueron significativamente más bajas ( $p < 0,005$ ), que aquellas encontradas en el grupo con DA leve. Al contrario, los niveles de sIgA en leche materna fueron extremadamente más elevados ( $p < 0,0001$ ) en la leche materna correspondiente a los niños no atópicos (Figura 4). Los mismos disminuyeron progresivamente acorde a la severidad de la DA.

**Tabla 3.** Contribución de los componentes clínicos en la severidad de la dermatitis atópica (SCORAD), en un grupo de lactantes evaluados en la Consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina.

Parámetro	Spearman r	IC 95%	Valor p (dos colas)
A Extensión	0,9099	0,8395 a 0,9503	< 0,0001
B Intensidad	0,9759	0,9558 a 0,9869	< 0,0001
C Subjetivo	0,7778	0,6243 a 0,8735	< 0,0001

Se encontró además una correlación positiva extremadamente significativa entre los valores de sCD23, IL-13 e IgE total con la severidad de la DA (SCORAD) (Tabla 4). En cambio, las citocinas reguladoras como TGF- $\beta_1$  e IL-10 así como los valores



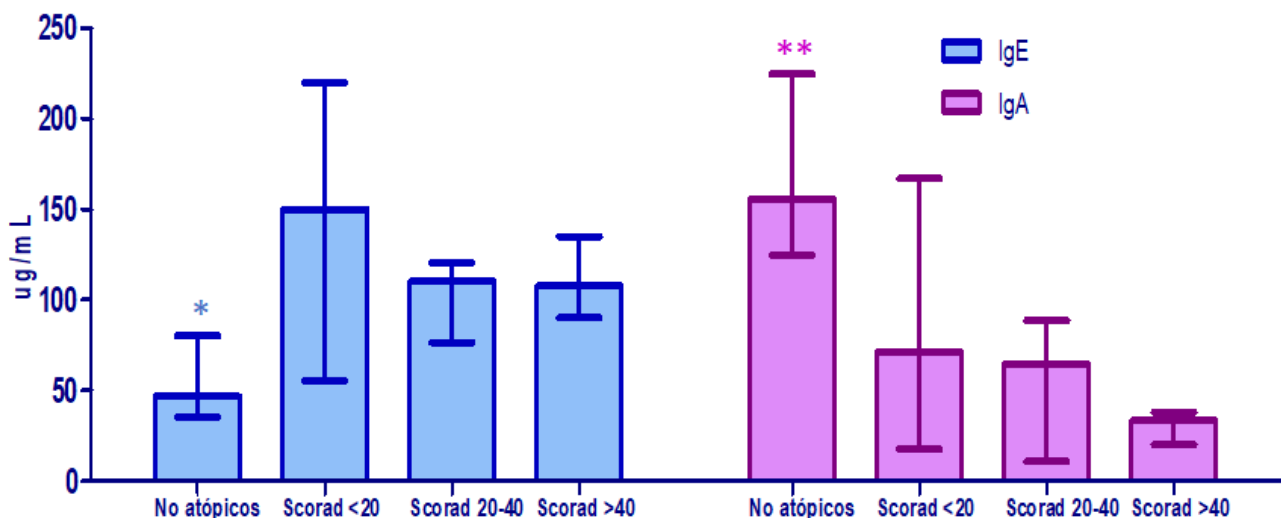
**Figura 3.** Comparación de los niveles de citocinas medidas en muestras de leche materna según la presencia y severidad de la dermatitis atópica en un grupo de lactantes Venezolanos. \* $p < 0,05$  sCD23: no atópicos vs Scorad <20 vs Scorad 20-40 vs Scorad >40; \*\* $p < 0,05$  IL-13: no atópicos vs Scorad <20 vs Scorad 20-40 vs Scorad >40; ‡ $p < 0,05$  TGF- $\beta$ : no atópicos vs Scorad <20 vs Scorad 20-40 vs Scorad >40; † $p < 0,05$  sCD14: Scorad >40 vs los otros grupos de severidad.

de IgA total se asociaron negativamente ( $p < 0,001$ ) a la severidad de la DA (Tabla 4).

## DISCUSIÓN

La dermatitis atópica (DA) se caracteriza por la localización típica de lesiones específicas de la piel de acuerdo a la edad. Los pacientes estudiados fueron lactantes, menores de 2 años, con una mediana de edad de 11 meses, lo cual determinó los hallazgos

característicos del SCORAD para ese grupo etario (Pucci *et al.*, 2005). Se encontró que la edad influyó en el SCORAD de los pacientes, ya que a menor edad, la severidad del SCORAD era mayor. El hecho de que la severidad de la DA sea mayor en lactantes más pequeños sugiere un mayor riesgo a contraer infecciones de la piel en este grupo etario. Estudios previos han aportado evidencias de que la infección por *S. aureus* precede en algunos casos el diagnóstico



**Figura 4.** Comparación de los valores de anticuerpos IgE total e IgA secretora Total medidos en muestras de leche materna según presencia y severidad de la Dermatitis atópica en un grupo de lactantes Venezolanos. \* $p < 0,05$  IgE: no atópicos vs los otros grupos de severidad; \*\* $p < 0,05$  IgA: no atópicos vs los otros grupos de severidad.

**Tabla 4.** Asociación entre mediadores inmunológicos presentes en la leche materna y la severidad de la DA en un grupo de lactantes evaluados en la Consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina.

	Mediadores pro alérgicos			
	IgE ( $\mu\text{g/ml}$ )	IL-13 ( $\text{pg/ml}$ )	sCD23 ( $\text{pg/ml}$ )	
N	46	46	46	
Spearman r	0,6395	0,8492	0,9019	
IC 95%	0,4215 a 0,7876	0,7377 a 0,9156	0,8257 a 0,9458	
Valor de p (dos colas)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
Significancia	***	***	***	
	Mediadores de regulación inmunológica			
	IgA ( $\mu\text{g/ml}$ )	IL-10 ( $\text{pg/ml}$ )	sCD14 ( $\text{pg/ml}$ )	TGF- $\beta$ ( $\text{pg/ml}$ )
N	46	46	46	46
Spearman r	-0,8060	-0,6570	-0,1517	-0,6620
IC 95%	-0,8903 a -0,6683	-0,7988 a -0,4460	-0,4306 a 0,1537	-0,8020 a -0,4531
Valor de P (dos colas)	< 0,0001	< 0,0001	0,3144	< 0,0001
Significancia	***	***	ns	***

clínico de DA (Meylan *et al.*, 2017). Por eso es importante estudiar los factores que pueden proteger o no frente a la DA en lactantes, particularmente en aquellos grupos de niños en alto riesgo social y biológico en donde las infecciones de la piel pueden conducir a situaciones de salud más complicadas. Se evidenció que el eczema, la liquenificación y las excoriaciones contribuyeron significativamente en forma similar al SCORAD, siendo las características clínicas más frecuentes en este grupo etario. Estos resultados coinciden con hallazgos de un estudio previo para evaluar la sensibilidad del SCORAD en niños y en lactantes, en el cual se encontró que cada parámetro del SCORAD contribuye de forma similar a la severidad de la DA en lactantes (Pucci *et al.*, 2005). Así estos resultados confirman que el SCORAD es un sistema adecuado para medir cuantitativamente la severidad de la DA en este grupo etario.

Ha sido ampliamente aceptado el hecho de que la lactancia materna tiene un papel importante en la prevención de patologías alérgicas (De Martinis *et al.*, 2020; Rajani *et al.*, 2018). Las glándulas mamarias son parte del sistema inmune de las mucosas y que los anticuerpos y citocinas presentes en la leche materna son por lo tanto un reflejo de la estimulación del sistema inmune asociado a la mucosa tanto respiratoria como intestinal en la madre (Brandtzaeg, 2010). Por esto, el micro ambiente inmunológico de la madre influye profundamente en el perfil de

mediadores inmunológicos que recibe el niño durante la lactancia, así como en el perfil inmunitario que desarrolla. De hecho se ha considerado la lactancia materna como un ingenioso sistema de integración natural entre el sistema inmune de la madre y el del niño (Brandtzaeg, 2010). En este trabajo, la presencia y severidad de la DA en el grupo de lactantes evaluados, se asoció al perfil inmunitario de la leche materna. Elevados niveles de citocinas y anticuerpos pro-alérgicos presentes en la leche materna contribuyeron al desarrollo y a la severidad de las lesiones de DA en el grupo de niños evaluado. La relación estrecha entre el consumo por parte de la madre atópica de alimentos potencialmente alérgicos durante el embarazo y la lactancia, además de la producción de citocinas como IL-4 e IL-13 (Lee *et al.*, 2016; Metcalfe *et al.*, 2016), podría favorecer la sensibilización alérgica frente a antígenos alimentarios en el lactante. De hecho, como se mencionó en la introducción, se han reportado valores más elevados de IL-13 e IL-4 en muestras de leche materna de madres atópicas comparados con los de madres no atópicas (Böttcher *et al.*, 1999). También, niveles elevados de IL-13 en muestras de leche materna de madres suecas han sido asociados con manifestaciones de atopia en sus respectivos lactantes (Tomičić *et al.*, 2010). Sin embargo un estudio más reciente realizado en muestras de leche materna proveniente de distintos países europeos reportó que la presencia de IL-13 en dichas

muestras tiene un papel protector frente al desarrollo de alergia durante el primer año de vida (Munblit *et al.*, 2017). Se necesitaría un estudio más preciso sobre el efecto que esta citocina puede tener en el desarrollo inmune del lactante y sobre que parámetros podría estar actuando. También trabajos preliminares han demostrado que los niveles de IgE en la madre de niños que recibieron lactancia materna se relacionan positivamente con el desarrollo de manifestaciones alérgicas en los niños durante la primera infancia (Wright *et al.*, 1999). En este trabajo, los niveles de IgE total en la leche materna de los niños con DA severa y moderada fueron más bajos que aquellos encontrados en la leche materna correspondiente a los niños con DA leve. En trabajos anteriores se ha reportado que niveles muy elevados de IgE total pueden bloquear el mecanismo de sensibilización de los mastocitos y la producción de IgE específica frente a distintos alérgenos particularmente en poblaciones tropicales expuestas a parásitos helmintos (Hagel *et al.*, 2013). Es conocido el hecho de que estas parasitosis estimulan de forma no específica elevados niveles de IgE total (Hagel *et al.*, 2013). En distintos modelos experimentales se ha reportado que el sCD23 actúa como una citocina inductora de la proliferación de linfocitos B productores de IgE (Pène *et al.*, 1988; Saxon *et al.*, 1990; Scheffel *et al.*, 2005). Trabajos anteriores realizados en distintos grupos de niños en Venezuela han reportado elevados niveles de sCD23 en suero (Hagel *et al.*, 2006) y saliva (Rivera *et al.*, 2015) de niños atópicos con manifestaciones cutáneas de alergia: En este trabajo encontramos que los niveles de sCD23 fueron muy elevados en las muestras de leche materna correspondientes a los niños con DA, correlacionando positivamente con el SCORAD, no obstante, es la primera vez que se reportan elevados niveles de sCD23 en leche materna en la literatura (hasta donde pudimos investigar), por lo que se necesitarían más estudios para confirmar estos hallazgos y analizar con mayor profundidad los mecanismos inmunológicos que esta citocina pudiera mediar en los niños lactantes.

A diferencia de lo observado en el grupo de niños con DA, en el perfil inmunológico de la leche materna correspondiente a niños sanos, hubo un claro predominio

de factores reguladores de la respuesta inmune con respecto a los mediadores pro alérgicos. Más aún se encontró una correlación inversa entre la presencia de IgA secretora, TGF- $\beta_1$  e IL-10 en la leche materna con la severidad de la DA. Existen evidencias de que valores elevados de TGF- $\beta_1$  e IL-10 en la leche materna protegen frente al desarrollo de alergia (Berdi *et al.*, 2019; Dawod y Marshall, 2019) y consecuentemente frente a la DA. También se ha demostrado en otros estudios el valor protector de la sIgA en la leche materna en relación con la presencia y severidad de la DA (Orivuori *et al.*, 2014).

En este trabajo no se encontró ninguna relación importante entre los niveles de sCD14 soluble medidos en leche materna con la presencia y la severidad de la DA, evidencias en trabajos realizados en otros países han sugerido que niveles reducidos de sCD14 en la leche materna se asocian con el desarrollo de atopia, eccema o ambos (Hua *et al.*, 2019) mientras que otros trabajos no han encontrado ninguna asociación (Logan *et al.*, 2018), en este sentido, valdría la pena en estudios posteriores evaluar las diferencias de los valores de sCD14 en muestras de leche materna de madres sometidas a distintos retos antigénicos y su impacto en el perfil inmunológico de los niños. Otro aspecto importante que influye en el control del desarrollo temprano de enfermedades atópicas es el tipo de bacterias que colonizan y forman tempranamente el microbioma en la mucosa intestinal (Kim *et al.*, 2019). Este proceso es influenciado por pre bióticos presentes en la leche materna que también pueden jugar un papel importante en la prevención del desarrollo de atopia durante la primera infancia (Brosseau *et al.*, 2019). De hecho los oligosacáridos de la leche materna humana, promueven la maduración de la microbiota, estimulando tempranamente el crecimiento de bifidobacterias las cuales están involucradas en el desarrollo de tolerancia frente a los alimentos y así en la prevención de alergias y el desarrollo de DA (Akkerman *et al.*, 2019). En conclusión, nuestros resultados indican que la presencia de un perfil “pro-atópico” caracterizado por elevados niveles de IgE total, IL-13 y sCD23 en la leche materna favorece el desarrollo de dermatitis atópica en los lactantes.

Mientras que, la presencia de elevados niveles de IgA secretora y citocinas reguladoras como la IL-10 y TGF- $\beta_1$  en la leche materna, protegen frente al desarrollo de esta patología. Por esto, es necesario realizar estudios con evaluaciones más minuciosas sobre los diferentes procesos inflamatorios de las madres, como infecciones exposición frente a alérgenos o procesos autoinmunes, para evaluar los efectos ocasionados por estos factores durante el periodo de la lactancia. Esto permitirá modificar el perfil inmunológico de la leche materna ayudando al desarrollo armónico del sistema inmune en el lactante y prevenir la aparición de signos clínicos de DA.

## REFERENCIAS

- AKKERMAN R, FAAS MM, DE VOS P. (2019). "Non-digestible carbohydrates in infant formula as substitution for human milk oligosaccharide functions: Effects on microbiota and gut maturation". *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:1486–1497.
- BRANDT E. (2011). "Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis". *J Clin Cell Immunol* 2(3):110.
- BARRERA GJ, SÁNCHEZ G. (2016). "Cytokine modulation (IL-6, IL-8, IL-10) by human breast milk lipids on intestinal epithelial cells (Caco-2)". *J Matern Neonatal Med* 29:2505–2512.
- BERDI M, DE LAUZON-GUILLAIN B, FORHAN A, CASTELLI FA, FENAILLE F, CHARLES MA, HEUDE B, JUNOT C, ADEL-PATIENT K. (2019). "Immune components of early breastmilk: Association with maternal factors and with reported food allergy in childhood". *Pediatr Allergy Immunol* 30:107–116.
- BIEBER T. (2020). "Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis". *Eur J Allergy Clin Immunol* 75(1):54–62.
- BÖTTCHER MF, JENMALM MC, GAROFALO RP, BJÖRKSTÉN B. (1999). "Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers". *International Archives of Allergy and Immunology* 319–320.
- BRANDTZAEG P. (2010). "The Mucosal Immune System and Its Integration with the Mammary Glands". *J Pediatr* 156:S8.
- BROSSEAU C, SELLE A, PALMER DJ, PRESCOTT SL, BARBAROT S, BODINIER M. (2019). "Prebiotics: mechanisms and preventive effects in allergy". *Nutrients* 11(8):1841.
- CACHO NT, LAWRENCE RM. (2017). "Innate Immunity and Breast Milk". *Front Immunol* 8:584.
- CARTLEDGE N, CHAN S. (2018). "Atopic Dermatitis and Food Allergy: A Paediatric Approach". *Curr Pediatr Rev* 14:171–179.
- CERUTTI A, RESCIGNO M. (2008). "The biology of intestinal immunoglobulin A responses". *Immunity* 28:740–50.
- CLAUSEN ML, SLOTVED HC, KROGFELT KA, ANDERSEN PS, AGNER T. (2016). "In vivo expression of antimicrobial peptides in atopic dermatitis". *Exp Dermatol* 25:3–9.
- DAWOD B, MARSHALL JS. (2019). "Cytokines and Soluble Receptors in Breast Milk as Enhancers of Oral Tolerance Development". *Front Immunol* 10:16.
- DE MARTINIS M, SIRUFO MM, SUPPA M, GINALDI L. (2020). "New perspectives in food allergy". *Int J Mol Sci* 21(4):1474.
- FEHERVARI Z. (2019). "Food tolerance". *Nat Immunol* 20:776.
- FIGUEROA-LOZANO S, DE VOS P. (2019). "Relationship Between Oligosaccharides and Glycoconjugates Content in Human Milk and the Development of the Gut Barrier". *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18: 121–139.
- GRAHAM F, EIGENMANN PA. (2020). "Atopic dermatitis and its relation to food allergy". *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 20(3):305–310.
- HAGEL I, CABRERA M, CRISTINA M, PRISCO D. (2013). "Helminthic Infections and Asthma in Respiratory Disease and Infection. En: Bassam H, Mahboub E. Respiratory Disease and Infection: A New Insight". InTech. Rijeka, Croatia.
- HAGEL I, CABRERA M, SÁNCHEZ P, RODRÍGUEZ P, LATTOUF JJ. (2006). "Role of the low affinity IgE receptor (CD23) on the IgE response against *Ascaris lumbricoides* in Warao Amerindian children from Venezuela". *Invest Clin* 47:241–251.
- HAGEL I, PUCCIO F, LÓPEZ E, LUGO D, CABRERA M, DI PRISCO MC. (2014). "Intestinal parasitic infections and atopic dermatitis among Venezuelan Warao Amerindian pre- school children". *Pediatr Allergy Immunol* 25:276–82.
- HANNIFIN J, RAJKA G. (1980). "Diagnostic features of atopic dermatitis". *Acta Derm Venereol* 92:44–47.
- HEERINGA JJ, RIJVERS L, ARENDS NJ, DRIESSEN GJ, PASMANS SG, VAN DONGEN JJM, DE JONGSTE JC, VAN ZELM MC. (2018). "IgE-expressing memory B cells and plasmablasts are increased in blood of children with asthma, food allergy, and atopic dermatitis". *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 73:1331–1336.
- HUA MC, SU HM, KUO ML, CHEN CC, YAO TC, TSAI MH, LIAO SL, LAI SH, CHI CY, SU KW, CHEN LC, YEY KW, HUANG JL. (2019). "Association of maternal allergy with human milk soluble CD14 and fatty acids, and early childhood atopic dermatitis". *Pediatr Allergy Immunol* 30:204–213.
- KIM WG, KANG GD, KIM HI, HAN MJ, KIM DH. (2019). "Bifidobacterium longum IM55 and Lactobacillus plantarum IM76 alleviate allergic rhinitis in mice by restoring Th2/Treg imbalance and gut microbiota disturbance". *Benef Microbes* 10:55–67.
- LEE JB, CHEN CY, LIU B, MUGGE L, ANGKASEKWINAI P, FACCHINETTI V, DONG C, LIU YJ, ROTHENBERG ME, HOGAN SP, FINKELMAN FD, WANG YH. (2016). "IL-25 and CD4+ TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy". *J Allergy Clin Immunol* 137:1216–1225.
- LEE JB, CHEN CY, LIU B, MUGGE L, ANGKASEKWINAI P,

- FACCHINETTI V, DONG C, LIU YJ, ROTHENBERG ME, HOGAN SP, FINKELMAN FD, WANG YH. (2016). "IL-25 and CD4+ TH2 cells enhance type 2 innate lymphoid cell-derived IL-13 production, which promotes IgE-mediated experimental food allergy". *J Allergy Clin Immunol* 137:1216–1225.
- LOGAN CA, WEISS JM, KOENIG W, STAHL B, CARR PR, BRENNER H, ROTHENBACHER D, GENUNEIT J. (2018). "Soluble CD14 concentration in human breast milk and its potential role in child atopic dermatitis: Results of the Ulm Birth Cohort Studies". *Clin Exp Allergy* 49:199–206.
- METCALFE JR, D'VAZ N, MAKRIDES M, GOLD MS, QUINN P, WEST CE, LOH R, PRESCOTT SL, PALMER DJ. (2016). "Elevated IL-5 and IL-13 responses to egg proteins predate the introduction of egg in solid foods in infants with eczema". *Clin Exp Allergy* 46:308–316.
- MEYLAN P, LANG C, MERMOUD S, JOHANNSEN A, NORRENBERG S, HOHL D, VIAL Y, PROD'HOM G, GREUB G, KYPRIOTOU M, CHRISTEN-ZAECH S. (2017). "Skin Colonization by *Staphylococcus aureus* Precedes the Clinical Diagnosis of Atopic Dermatitis in Infancy". *J Invest Dermatol* 137:2497–2504.
- MUNBLIT D, TRENEVA M, PERONI DG, COLICINO S, CHOW LY, DISSANAYEKE S, PAMPURA A, BONER AL, GEDDES DT, BOYLE RJ, WARNER JO. (2017). "Immune components in human milk are associated with early infant immunological health outcomes: A prospective three-country analysis". *Nutrients* 9(6):532.
- NAKATSUJI T, CHEN TH, NARALA S, CHUN KA, TWO AM, YUN T, SHAFIQ F, KOTOL PF, BOUSLIMANI A, MELNIK AV, LATIF H, KIM JN, LOCKHART A, ARTIS K, DAVID G, TAYLOR P, STREIB J, DORRESTEIN PC, GRIER A, GILL SR, ZENGLER K, HATA TR, LEUNG DYM, GALLO RL. (2017). "Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis". *Sci Transl Med* 9:aah4680.
- ORANJE AP, GLAZENBURG EJ, WOLKERSTORFER A, DE WAARD-VAN DER SPEK FB. (2007). "Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score". *Br J Dermatol* 157:645–648.
- ORIVUORI L, LOSS G, RODUIT C, DALPHIN JC, DEPNER M, GENUNEIT J, LAUENER R, PEKKANEN J, PFEFFERLE P, RIEDLER J, ROPONEN M, WEBER J, VON MUTIUS E, BRAUN-FAHRLÄNDER C, VAARALA O. (2014). "Soluble immunoglobulin A in breast milk is inversely associated with atopic dermatitis at early age: the PASTURE cohort study". *Clin Exp Allergy* 44:102–112.
- ORTIZ D, AFONSO C, HAGEL I, RODRIGUEZ O, ORTIZ C, PALENQUE M, LYNCH NR. (2000). "Influencia de las infecciones helmínticas y el estado nutricional en la respuesta inmunitaria de niños Venezolanos". *Rev Panam Salud Publica* 8:156–163.
- PAGE SS, WESTON S, LOH R. (2016). "Atopic dermatitis in children". *Aust Fam Physician* 45:293–296.
- PÈNE J, ROUSSET F, BRIÈRE F, CHRÉTIEN I, WIDEMAN J, BONNEFOY JY, VRIES JED. (1988). "Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen". *Eur J Immunol* 18:929–935.
- POLONKAI E, GYIMESI E, KOVÁCS I, CSILLAG A, BALLA GY, RAJNAVÖLGYI É, BÁCSI A, SIPKA S. (2016). "A possible role of elevated breast milk lactoferrin and the cytokine il-17 levels in predicting early allergy in infants: a pilot study". *Budapest Acta Aliment* 45:157–162.
- POLS DHJ, WARTNA JB, MOED H, VAN ALPHEN EI, BOHNEN AM, BINDELS PJE. (2016). "Atopic dermatitis, asthma and allergic rhinitis in general practice and the open population: a systematic review". *Scand J Prim Health Care* 34:143–150.
- PUCCI N, NOVEMBRE E, CAMMARATA MG, BERNARDINI R, MONACO MG, CALOGERO C, VIERUCCI A. (2005). "Scoring atopic dermatitis in infants and young children: distinctive features of the SCORAD index". *Allergy* 60:113–116.
- RAJANI PS, SEPO AE, JÄRVINEN KM. (2018). "Immunologically Active Components in Human Milk and Development of Atopic Disease, With Emphasis on Food Allergy, in the Pediatric Population". *Front Pediatr* 6:218
- RIGOTTI E, PIACENTINI GL, RESS M, PIGOZZI R, BONER AL, PERONI DG. (2006). "Transforming growth factor-β1 and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants". *Clin Exp Allergy* 36:614–618.
- RIVERA Z, BRAVO N, RIVERA I. (2015). "Influencia de la alergia alimentaria y la infección por *Giardia duodenalis* en la prevalencia y severidad de la dermatitis atópica en niños preescolares". *dermatol venez* 53:19–25.
- RODRÍGUEZ OL, HAGEL I, GONZÁLEZ Y, ROQUE ME, VÁSQUEZ N, LÓPEZ E, DI PRISCO MC. (2004). "Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*". *J Trop Pediatr* 50:68–72.
- RODRÍGUEZ OL, ORTIZ-PRINCZ D, CAVAZZA ME, LÓPEZ E, HAGEL I. (2011). "Evaluación de la posible asociación entre la presencia de parásitos intestinales y *Helicobacter pylori* en población infantil de la etnia Warao, Venezuela". *Bol Malariol y Salud Ambient* 51:41–50.
- SATITSUKSANOVA P, JANSEN K, GŁOBIŃSKA A, VAN DE VEEN W, AKDIS M. (2018). "Regulatory Immune Mechanisms in Tolerance to Food Allergy". *Front Immunol* 9:2939.
- SAXON A, KE Z, BAHATI L, STEVENS RH. (1990). "Soluble CD23 containing B cell supernatants induce IgE from peripheral blood B-lymphocytes and costimulate with interleukin-4 in induction of IgE". *J Allergy Clin Immunol* 86:333–344.
- SCHEFFEL F, HEINE G, HENZ BM, WORM M. (2005). "Retinoic acid inhibits CD40 plus IL-4 mediated IgE production through alterations of sCD23, sCD54 and IL-6 production". *Inflamm Res* 54:113–118.
- SEPO AE, FRIDY S, VARRONE J, GILL SR, GRIER A, LOMAS JM, MARTINA C, LOONEY RJ, JÄRVINEN-SEPO KM. (2017). "High Microbiome Diversity and IgA Responses in Breast Milk of Old Order Mennonites with a Low Prevalence of Allergic Diseases". *J Allergy Clin Immunol* 139:AB278.
- SITARIK AR, BOBBITT KR, HAVSTAD SL, FUJIMURA KE, LEVIN AM, ZORATTI EM, KIM H, WOODCROFT KJ,

- WEGIENKA G, OWNBY DR, JOSEPH CL, LYNCH SV, JOHNSON CC. (2017). "Breast milk TGF $\beta$  is associated with neonatal gut microbial composition". *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 65:60–67.
- TOMIČIĆ S, JOHANSSON G, VOOR T, BJÖRKSTÉN B, BÖTTCHER MF, JENMALM MC. (2010). "Breast milk cytokine and IgA composition differ in estonian and swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy". *Pediatr Res* 68:330–334.
- TSAKOK T, MARRS T, MOHSIN M, BARON S, DU TOIT G, TILL S, FLOHR C. (2016). "Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review". *J Allergy Clin Immunol* 137:1071–1078.
- WRIGHT AL, SHERRILL D, HOLBERG CJ, HALONEN M, MARTINEZ FD. (1999). "Breast-feeding, maternal IgE, and total serum IgE in childhood". *J Allergy Clin Immunol* 104:589–594.

# Factores determinantes de tuberculosis entre los indígenas Warao del Delta Venezolano: genética e inmunidad

**Zaida Araujo-García<sup>1</sup>**

zaraujogarcia@yahoo.com  
<https://orcid.org/0000-0001-6676-0449>

**Aime Tillett<sup>1,2</sup>**

aimetillett@gmail.com

**Jacobus H. De Waard<sup>1</sup>**

jacobusdeward@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Escuela de Antropología, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

En Venezuela existen 724.592 habitantes de los 52 pueblos indígenas venezolanos; los indígenas Warao el segundo pueblo más importante del país, fueron conocidos en la literatura histórica y antropológica de los siglos XVI-XX como Guaraúnos; no obstante, su auto denominación es la voz: Warao; su significado: “dueños de la canoa”. El pueblo Warao habita principalmente en las islas y caños del delta del río Orinoco, estado Delta Amacuro. Su contacto con las infecciones ha sido reciente luego del acceso de tanto los Criollos como de los misioneros europeos que arribaron a sus comunidades luego de que permanecieron aislados por mucho tiempo. Trabajo sobre la cultura Warao deja saber desde 1980, que los Warao sufrían y morían en forma trágica de enfermedades tales como; la tuberculosis, el catarro, la viruela, el sarampión y los padecimientos gastrointestinales. La poca difusión y el marginamiento al que ha sido relegado el conocimiento del sufrimiento de las enfermedades de nuestras comunidades indígenas, es el motivo por el cual queremos hacerlas del conocimiento no solo a los especialistas sino a un numeroso público, que aún las desconoce. El objetivo de la presente información en salud alrededor del pueblo Warao, es darla a conocer a las autoridades sanitarias con la finalidad de que se implementen las medidas para el control de la tuberculosis. Los resultados presentados de manera resumida y derivados de las investigaciones científicas apoyadas por el Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, nos han permitido avanzar en el conocimiento para entender que factores de riesgo como; genéticos, inmunológicos y ambientales están contribuyendo a que permanezca una alta prevalencia de tuberculosis entre los indígenas Warao.

**Palabras clave:** Indígenas Warao; Delta Amacuro; Tuberculosis; Respuesta inmune; Genética.

## DETERMINANT FACTORS OF TUBERCULOSIS AMONG WARAO INDIGENOUS FROM THE VENEZUELAN DELTA: GENETIC AND IMMUNITY

## ABSTRACT

In Venezuela there are 724,592 inhabitants from 52 indigenous groups of Venezuela;

Warao indigenous is the second most important ethnic of the country, they were known in the history and anthropological literature of the XVI-XX centuries like Guaraúnos; however, their autonomination is the voice: Warao, its means “dueños de la canoa”. They mainly live at the Venezuelan Orinoco delta. Historically, indigenous peoples suffered enormously after contact with western cultures. The Warao population remained largely isolated for millennia and largely unknown due to its their difficult swampland habitat, so it is possible to think that their contact with infections has been very limited until recently, when their contacts with individuals of European descent increased and when “Criollos”, members of the Venezuelan population, and missionaries have entered their habitat in sizable numbers. Previous reports in 1980 describe the existence of deaths derived from epidemics of smallpox, measles, plague, tuberculosis and gastrointestinal problems. The aim of studies was advancing in the knowledge of the risk factors such as; genetic, immune and environment, which are attributable to proximate determinants, given their prevalence and the epidemiological evidence linking them to tuberculosis among Warao from the Venezuelan Orinoco delta. As regards to health conditions among Warao indigenous has proven to be a growing challenge, the findings derived from scientific investigations, which had been supported by Dr. Jacinto Convit' Biomedicine Institute, could suggest that sanitary authorities to track the status of Warao indigenous health for implementing and improving tuberculosis surveillance.

**Keywords:** Warao indigenous; Tuberculosis; Delta Amacuro; Immune response; Genetic.

## INTRODUCCIÓN

Gran parte de las sociedades nativas de América desaparecieron luego del contacto con las enfermedades del viejo mundo. Se estima que la población amerindia se redujo en 90% por efecto de epidemias contra las que no tenían inmunidad ni conocimientos para enfrentarlas. Los pueblos indígenas que lograron sobrevivir resultaron profundamente afectados y tuvieron que aislarse o migrar para alejarse de las zonas de conflicto con los europeos, experimentando una lenta recuperación. Sin embargo, desde mediados del siglo XX las poblaciones indígenas latinoamericanas y del Caribe

han experimentado un aumento poblacional de más del 70% y hoy se estiman en unos 48,4 millones de personas divididos en 400 grupos indígenas. Cinco países agrupan casi el 90% de la población indígena regional: Bolivia, Guatemala, Perú, Ecuador y México (Montenegro y Stephens, 2006).

En Venezuela, los pueblos indígenas han tenido un rápido crecimiento en las últimas décadas, debido en gran medida al acceso a servicios de salud, en especial a la vacunación. Este es, de hecho, uno de los principales estímulos para el acercamiento de sus comunidades a la sociedad nacional y uno de sus principales reclamos (Freire, 2007). Algunas enfermedades infecciosas endémicas constituyen un problema de salud pública en las zonas indígenas del país, entre estas la tuberculosis (TB). Los territorios inexpugnables del Delta no sólo impidieron que los colonizadores españoles alcanzaran a los indígenas Warao, también limitan actualmente el acceso a los servicios de salud y a servicios sanitarios básicos.

### **POBLACIÓN INDÍGENA WARAO: UBICACIÓN GEOGRÁFICA, HISTORIA Y DEMOGRAFÍA**

De acuerdo con el Censo Nacional de Población del año 2011, los indígenas de Venezuela totalizaron 724.592 personas, pertenecientes a 52 pueblos indígenas que corresponden al 2,7% de la población nacional. El pueblo indígena con mayor población es el Wayúu (57% de la población indígena); y el segundo es el Warao, con 48.771 habitantes (6,7%) (INE 2015). La población Warao se distribuye principalmente en el estado Delta Amacuro, donde habitaban 40.280 personas (83% del total), estando también presentes en los estados Monagas, Bolívar y Sucre. En el estado Delta Amacuro se distribuyen principalmente en el municipio Antonio Díaz, donde residen el 59%; le siguen Túcupita (29%), Pedernales (11%) y Casacoima (1%), (INE, 2011). Los Warao están establecidos en, al menos, 459 comunidades, y la mayoría de los asentamientos están habitados por 50 a 250 individuos, aunque existen comunidades con más de 500 habitantes (Ayala y Wilbert, 2012; INE, 2018).

Su economía de subsistencia se basaba en la pesca y la recolección de productos selváticos. El idioma Warao es una lengua clasificada como aislada o

independiente, con tres variantes dialectales principales comprensibles entre sí (Ayala y Wilbert, 2012). Su territorio ancestral es el “propio delta”, una llanura de unos 22.500 km<sup>2</sup> demarcada por el caño Manamo en el oeste, el Río Grande al sur y el océano Atlántico, que bordea todas sus costas.

La expansión de la actividad petrolera y la contaminación ambiental provocada en el delta, tuvieron profundos impactos en la vida Warao. El cierre del caño Manamo en 1965, afectó a cientos de indígenas del Delta occidental y el estado Monagas, que se vieron obligados a emigrar hacia Túcupita y otros centros urbanos (Ayala y Wilbert, 2012).

La epidemia de cólera entre 1992 y 1993, cobró la vida de cerca de 500 Warao, forzando a cientos de personas a desplazarse en busca de atención (Briggs y Mantini, 2004). Otros se asentaron en las inmediaciones del basurero de Cambalache, cerca de Puerto Ordaz, para dedicarse a la recuperación de desechos; y también se han incorporado como mano de obra en las minas ilegales de oro del estado Bolívar.

Durante los últimos cinco años, la crisis económica, la creciente situación de inseguridad alimentaria y hambre, la falta de acceso a servicios de salud y medicinas, impulsaron a muchos Warao a emigrar, principalmente hacia Brasil, en busca de ayuda y refugio. Para el año 2018 se estimaba que más de 3.000 Warao se encontraban en ciudades del norte de Brasil como Pacaraima, Boa Vista, Manaus, Santarém y Belém de Pará (García-Castro, 2018).

### **CONDICIONES DE VIDA Y SITUACIÓN GENERAL DE SALUD DEL PUEBLO WARAO**

Los datos del Censo del 2011, demuestran las grandes brechas e inequidades en las condiciones de vida de las comunidades Warao del estado Delta Amacuro, respecto a la población Criolla de la misma entidad, y a los indicadores promedio a nivel nacional. Se observa que las condiciones de vida del pueblo Warao se caracterizan por el mayor promedio de personas por hogar a nivel nacional (5,4), una elevada proporción de hogares presentando hacinamiento (51%), déficit de servicios de saneamiento básico (69%), falta de acceso al agua potable (86%), carencia de sistemas de aguas servidas (85%), y manejo de

desechos (96%), las mayores tasas de población analfabeta (58%), de hogares con niños que no asisten a la escuela (20%), los más altos niveles de pobreza (28%) y pobreza extrema (55%) del país (INE, 2011).

La principal dificultad para conocer la situación de salud del pueblo Warao es la falta de acceso a la información epidemiológica oficial, la cual se encuentra censurada por el Estado venezolano. Antecedentes tempranos relacionados con la salud de los indígenas Warao refieren que dentro de las comunidades Warao se observaba al indígena postrado por el hambre y las enfermedades provocadas mayormente por la TB, el catarro, la viruela, el sarampión y los padecimientos gastrointestinales (Barreto *et al.*, 1980).

Las causas de morbilidad registradas en pacientes Warao que acudieron al hospital “Luis Razetti” de Túcupita entre 2015 y 2017 fueron: síndrome diarreico (34% de los casos), deshidratación (13%), infección respiratoria (10%), neumonía (10%) y desnutrición (9%). Las siguientes causas en orden de importancia fueron: síndrome emético, anemia, síndrome doloroso abdominal, síndrome febril, síndrome coqueluchoide, TB, VIH, intolerancia oral, bronquiolitis, paludismo, bronconeumonía y emponzoñamiento ofídico (MPPS, 2015-2017).

Uno de los más graves problemas de salud en la actualidad es el VIH-Sida, que se identificó por primera vez entre los indígenas Warao en el año 2007; la epidemia tuvo una evolución explosiva, duplicando el número de infectados cada 10 meses y en aproximadamente una década el 9,55% de la población había sido infectada (Villalba *et al.* 2013). Estas cifras representan una prevalencia dramáticamente elevada, aproximadamente 10 veces mayor a la mundial, lo cual puede ser devastador para este pueblo indígena (de Waard *et al.*, 2017).

Las causas de mortalidad en indígenas del estado Delta Amacuro, en el año 2013 fueron: diarrea, gastroenteritis y otras enfermedades infecciosas intestinales (24%), infecciones respiratorias agudas y otras enfermedades respiratorias (12,2%), enfermedades del corazón (9,2%) y enfermedad por VIH (7,7%). Otras causas en orden de importancia fueron

cáncer, causas externas, enfermedades del sistema digestivo, desnutrición y ciertas afecciones originadas en el período perinatal. También se notificaron muertes por TB respiratoria, complicaciones del embarazo, parto y puerperio y tos ferina (MPPS, 2015b).

Delta Amacuro presenta las mayores tasas de morbilidad (65,6 x 100.000) y mortalidad (6,1 x 100.000) por TB a nivel nacional (MPPS 2015a, MPPS 2015b), pero la mayoría de los casos notificados en la entidad corresponden a indígenas Warao (82%). La población Warao de Delta Amacuro presenta las tasas de TB más altas registradas en el país, con una prevalencia alarmantemente elevada en menores de 15 años (Fernández de Larrea *et al.*, 2002).

## **ESTUDIOS DE LOS FACTORES DETERMINANTES DE TUBERCULOSIS EN LOS INDÍGENAS WARAO**

### **Condiciones y susceptibilidad a la tuberculosis**

Para 1999 Venezuela reportó una tasa de prevalencia de 26,1/100.000 habitantes. A diferencia de otros estados del territorio nacional, en Delta Amacuro hay un alto número de habitantes indígenas, los indígenas Warao, por lo tanto, podría decirse que las altas tasas obtenidas en este estado se deben esencialmente a su estructura poblacional indígena (MSAS, 1999). El estado Delta Amacuro, para el año 1998, tenía la tasa de prevalencia más alta de TB en Venezuela, con 54,6/100.000 habitantes, incrementándose a 93,2/100.000 habitantes en el año 1999, con 124 casos registrados. (MSAS, 1999).

El incremento de esta tasa fue debido al diagnóstico y registro de los casos de TB por las campañas de pesquisa realizadas durante ese período en dicha población por el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, liderizado por el Dr. Jacobus H. de Waard, en conjunto con el Programa Regional de Control de la TB del estado Delta Amacuro. Aún así, se piensa que la tasa debe ser más alta, debido al subregistro que suele ocurrir en estos tipos de poblaciones. Aunado al aporte del Laboratorio de Tuberculosis, estuvo el interés del equipo del Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Infecciosas, liderizado por la Dra. Zaida Araujo; para conocer las condiciones inherentes al ser humano, en

este caso de los indígenas Warao, que podrían estar asociadas a diferencias genéticas, específicamente a nivel del sistema inmunitario de esta población indígena en comparación con la Criolla, esto basado en los hallazgos derivados de los estudios inmunogenéticos realizados en los indígenas Warao y la población Criolla, que fueron llevados a cabo por la Dra. Zulay Layrisse en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), y publicados en los años 1988 y 1997, los cuales mostraron que existen diferencias inmunogenéticas entre ambas poblaciones; herencia y segregación de DW, un antígeno clase II, de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA o Human Leukocyte Antigens), actualmente conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), haplotipos del HLA, definidos en desequilibrio de ligamiento, solamente con células homocigotas de origen Warao y asociaciones DR/DQ no vistas o descritas previamente en otras poblaciones humanas (Layrisse *et al.*, 1988; Makhatadze *et al.*, 1997). Esta condición encontrada en los indígenas Warao podría predisponer a la susceptibilidad a las infecciones, entre ellas a la debida por *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual habría que demostrarlo y este fue el reto que asumió nuestro equipo junto con el Laboratorio de Tuberculosis.

### **PREVALENCIA DE INFECCIÓN ACTIVA POR M. TUBERCULOSIS**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2006 Venezuela poseía una tasa estimada de incidencia y de prevalencia de TB que hacía que ocupara la cuarta posición en Suramérica. En agosto de ese mismo año, el Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS), publicó el Anuario de Mortalidad 2005, en el cual se refleja a la TB como la decimoctava causa de muerte a nivel nacional (MSDS, 2006); además, según datos del Instituto Nacional de Estadísticas (INE), y la Coordinación del Programa de Control Regional de Tuberculosis del estado Delta Amacuro; desde el año 1999, el estado Delta Amacuro lideriza con las prevalencias de TB más altas del país, siendo el Municipio Antonio Díaz el más afectado; esto debido a la contribución de los resultados obtenidos de proyectos de investigación llevados a cabo por el

Laboratorio de Tuberculosis, los cuales permitieron conocer la muy alta prevalencia de TB que presentaba el estado Delta Amacuro para el año 2000, especialmente en comunidades del Municipio Antonio Díaz (INE, 2007; MPPS, 2007).

La poca difusión y el marginamiento a que ha sido relegado el conocimiento del padecimiento de las enfermedades de nuestras comunidades indígenas; fue el motivo por el cual quisimos comenzar las primeras investigaciones, las cuales estuvieron dirigidas a conocer la prevalencia de la TB entre la población Warao infantil de las comunidades del Municipio Antonio Díaz. En vista de que en Venezuela no existía publicado antes del año 2000, un sistema de puntuación para el diagnóstico de TB infantil en zonas rurales con infraestructuras inadecuadas, y menos aún, un sistema validado, apto para ser implementado en las comunidades indígenas Warao o rurales con alta prevalencia de TB en adultos. El equipo de trabajo desarrolló a partir del año 1999 una metodología sencilla para diagnosticar TB infantil en la población Warao, aplicando parámetros epidemiológicos y criterios clínicos en una población total de 502 niños Warao provenientes de San Francisco de Guayo y comunidades vecinas; a partir de los 502 niños evaluados, se seleccionaron 27 niños menores de 15 años con una clínica compatible con pacientes con TB. Los resultados obtenidos, cuando se utilizaron métodos clínicos, microbiológicos e inmunológicos de tipo humoral, mostraron que entre los niños con radiología patológica, 7 (43%) tenían una o más confirmaciones adicionales: 3 (42%) pacientes fueron positivos por BK/cultivo y 5 (71%) por serología, estos resultados permitieron establecer que la prevalencia de TB infantil en niños de 0 a 15 años era de 3,2%; equivalente a una altísima tasa de 3190/100.000 niños (Fernández de Larrea *et al.*, 2002). En conclusión, la metodología simple desarrollada para detectar TB en niños demostró su utilidad; se recomendó que la misma debe ser aplicada en toda la población infantil Warao, y que debe hacerse el seguimiento de los casos y la investigación de contactos de cada uno de los pacientes adultos diagnosticados en la búsqueda activa y continua de esta enfermedad.

## VALORES HEMATOLÓGICO Y COMPLEMENTO

En vista de que existen diferencias inmunogenéticas entre la población Warao y la Criolla; quisimos evaluar los valores de los parámetros hematológicos de dos poblaciones diferentes con TB; la población de los indígenas Warao e individuos Criollos. Se estudiaron pacientes y controles Warao y Criollos adultos, y niños controles Warao. Ambos grupos de Warao; pacientes y controles presentaron valores significativamente bajos tanto de concentración de hemoglobina corpuscular media como de la hemoglobina, la cual se correlacionó con una hipocromía eritrocitaria, en comparación con los dos grupos de Criollos.

A diferencia de los Criollos, los niños Warao al igual que los adultos Warao, aún en ausencia de enfermedad presentaron una fórmula leucocitaria caracterizada por monocitosis, aumento del porcentaje de linfocitos y disminución del porcentaje de neutrófilos (Araujo *et al.*, 2003). El encuentro de que esté presente el mismo perfil de conteo de glóbulos blancos entre niños y adultos Warao con una fórmula leucocitaria caracterizada por monocitosis, aumento del porcentaje de linfocitos y disminución del porcentaje de neutrófilos pudiera ser el resultado de factores genéticos, malnutrición, o infecciones por virus, bacterias o parásitos, estos últimos altamente prevalentes entre las comunidades indígenas Warao. Estos hallazgos nos indujeron a comenzar el estudio de la respuesta inmunitaria; inmunidad humoral, celular y algunos aspectos de la inmunidad innata, en los niños de estas comunidades con el objeto de establecer si son especialmente sensibles a padecer la infección por *M. tuberculosis*. Los resultados muestran que en ambos grupos de niños Warao; pacientes y controles, se observa un perfil inmunológico caracterizado por un aumento en los niveles de los componentes C3 y C4 del complemento (González *et al.*, 2003).

El papel importante que tiene el complemento en el humano durante la TB ha sido puesto en evidencia a través del aumento significativo de los componentes C3 y C3d, los cuales se han encontrado correlacionado con el aumento de complejos inmunes en pacientes

con TB no tratados, sugiriéndose que la activación del complemento por estos complejos previene que la TB conlleve a una patología mediada por complejos inmunes como es conocido que ocurre en diferentes patologías (May *et al.*, 1983). El estudio del papel que tiene el complemento durante la TB fue estudiado también en indígenas Warao y en Criollos adultos, tomando en cuenta la positividad o negatividad de la reactividad a la prueba de la tuberculina o TST (también prueba del PPD).

Los resultados mostraron que con la excepción de los grupos controles Warao y Criollos negativos a la TST, se encontró un significativo aumento del porcentaje de individuos con niveles disminuidos del componente C3 del complemento; así como también para el componente C4, en comparación con ambos grupos pacientes; Warao y Criollos (Araujo *et al.* 2006). El papel de protección que pudiera tener el complemento en los niños Warao debido a los altos niveles de C3 y C4, tengan o no TB, podría ser atribuido a una adaptación protectora de esta población indígena frente a las malas condiciones de salubridad que existen en sus comunidades, pero que se pierde en el adulto condicionado por los altos niveles de infecciones a diferentes agentes patógenos que se adquieren desde temprana edad.

### **TUBERCULOSIS Y RESPUESTA INMUNE**

La TB es principalmente una enfermedad del sistema respiratorio, y se transmite al toser y estornudar. Las altas prevalencias de TB son debido al hecho de que por un lado no se detectan los pacientes a tiempo, y por otro, al retardo que existe en impedir la transmisión de la infección de una persona a otra, lo cual es debido en parte a la baja sensibilidad que tiene la técnica de tinción o baciloscopia (40%-60%), el método de oro, altamente sensible, el cultivo de *M. tuberculosis* es retardo, debido a lo lento que crece la bacteria; aunado está el hecho de que el 75% de los pacientes con TB extrapulmonar, y el 95% de los niños tienen baciloscopia negativa; por lo que se hace necesario encontrar una herramienta adicional de diagnóstico de TB que sea rápida como la serología, que permita detectar los casos a tiempo e interrumpir la transmisión y mejorar el control de TB en la

población indígena Warao e inclusive en la población Criolla. La mayoría de los casos de TB ocurre en países poco desarrollados con recursos económicos limitados en los que el diagnóstico depende principalmente del examen clínico, los hallazgos radiográficos y la confirmación con frotis y cultivo (Rivas *et al.*, 2005).

Otra posibilidad diagnóstica interesante es la detección de material genético de la micobacteria, mediante técnicas moleculares de amplificación genética basadas en el uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Como es de esperarse, la utilidad de estas pruebas es mayor cuando la baciloscopia es positiva, circunstancia en la cual la especificidad y sensibilidad son superiores a 95%. Sin embargo, cuando la baciloscopia es negativa, la sensibilidad se reduce entre 40% y 70%. Si bien el valor diagnóstico de las pruebas genéticas rápidas es indiscutible, su aplicabilidad en la práctica clínica diaria depende del valor pronosticador que posean.

La reciprocidad que se establece entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador determina el control o no de la infección. Se conoce que una minoría de las personas que son infectadas por *M. tuberculosis* es capaz de progresar a enfermedad clínica. Se puede decir, en términos generales, que el 90% de las personas tendrán controlados los bacilos en estado latente para toda la vida, por medio de su sistema inmunológico; un 5% presentará TB primaria progresiva y el otro 5% presentará la enfermedad en estados tardíos de la vida, lo que se denomina TB de reactivación o post-primaria (Rivas *et al.*, 2005).

En los individuos resistentes, el control de la infección o de los bacilos tuberculosos que se encuentran en la región alveolar requiere principalmente del desarrollo de una respuesta de inmunidad celular del tipo Th1. Este tipo de respuesta incluye la participación de los macrófagos alveolares, los linfocitos T CD4+ y CD8+, principalmente los linfocitos T  $\gamma\delta$  y la producción de citocinas como: IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 y TNF- $\alpha$ . Aunado están las quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e IL-8 que juegan un papel muy importante en la migración de las diferentes subpoblaciones celulares al sitio de

infección para la formación del granuloma. Además, es primordial el papel de las células “natural killer” (NK), y de las células epiteliales como parte de la respuesta de inmunidad innata (Rivas *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta el papel preponderante y esencial que tiene la respuesta inmunitaria tanto innata como específica tanto humoral como celular, nuestro equipo comenzó con el estudio de dicha respuesta.

### **SEROLOGÍA EN NIÑOS: POLICLONALIDAD**

Los resultados del estudio de la respuesta humoral no específica muestran que, tanto en niños Warao pacientes como en controles, se observa hiper gamma globulinemia con producción de los isotipos IgG, IgM, IgE e IgAs. El isotipo IgA solo se detectó en el grupo de los pacientes, lo cual sugiere que este isotipo podría ser un marcador de enfermedad activa. La respuesta humoral de la policlonalidad o niveles totales de inmunoglobulina E (IgE) mostraron un prominente aumento en el 100% de los niños Warao (González *et al.*, 2003).

La policlonalidad observada es independiente de la reactividad al PPD y de la vacunación con BCG. En niños menores de 7 años, la reactividad al PPD es similar y también independiente de la vacunación con BCG. Se encontró que entre los niños negativos a la tuberculina o PPD, un 80% también presentaron estados de anergia o falta de reactividad celular al antígeno de *Candida* (González *et al.*, 2003). Estos hallazgos y el hecho de saber que la respuesta inmunitaria desde una temprana edad en estos niños está dirigida a defenderlos de múltiples gérmenes, pueden conducir a que esta respuesta sea anérgica o no sea simplemente la adecuada para defenderlos contra *M. tuberculosis*.

En los últimos años, un alto número de investigaciones han orientado sus esfuerzos a diseñar nuevas pruebas diagnósticas y a mejorar el rendimiento de los métodos serológicos.

Los anticuerpos de las tres clases de Inmunoglobulinas; IgA, IgG e IgM son los componentes de la respuesta humoral madura, siendo los anticuerpos de las clases IgG los más importantes

de la respuesta inmune adaptativa en la mayoría de las infecciones.

Se ha sugerido que la presencia de niveles elevados de IgM está asociada a infección reciente por *Mycobacterium* en contactos, pero la IgG al estado de enfermedad activa, ésta última se encuentra aumentada aún después del tratamiento, sin embargo, la IgA se ha reportado sin variación durante la enfermedad de TB (Weldingh *et al.*, 2005).

### **INMUNIDAD HUMORAL ESPECÍFICA**

Los métodos serológicos para el diagnóstico de TB se han venido realizando con el fin de lograr un máximo en la sensibilidad y especificidad para la detección de pacientes infectados con el bacilo de la TB, tanto en niños como en adultos (Araujo *et al.* 2004). La principal ventaja de éstos es que permite obtener resultados en un corto período de tiempo, lo cual permite la aplicación de un tratamiento lo más pronto posible. La principal desventaja que presentan las pruebas serológicas, es la variabilidad de respuesta de los anticuerpos frente a un antígeno, que puede darse en la población mundial. Esto representa un reto para conseguir las combinaciones adecuadas de antígenos y/o isotipos que demuestren una sensibilidad suficientemente alta para la detección de pacientes con infecciones tuberculosas que evite los falsos negativos, y/o una alta especificidad para evitar los falsos positivos, lo cual permitiría no administrar un tratamiento inoportuno que puede inducir resistencia. En este sentido el equipo de trabajo comenzó el estudio la respuesta inmune humoral específica contra antígenos de *M. tuberculosis* con la finalidad de conseguir un método que adicional a los métodos clínico y epidemiológico ayude al diagnóstico precoz de la TB.

### **INMUNIDAD HUMORAL ESPECÍFICA EN NIÑOS**

El estudio de la respuesta humoral específica de los isotipos; IgA, IgG, IgE e IgA secretora (IgAs) contra 3 antígenos de *M. tuberculosis*; PPD, HSP60, 38kDa, se realizó en niños menores de 15 años. Los hallazgos mostraron que la combinación de 3 isotipos: IgG anti-PPD, IgE anti-PPD, e IgAs anti-38kDa conllevó al aumento de la sensibilidad a 64,7%, en comparación a

los métodos que utilizaban un solo isotipo, así como también con los métodos comerciales tales como Myco G and Complex Plus (the Omega diagnostics commercial kits). La especificidad de la combinación fue de 81,8%; mientras que los kits comerciales mostraron ser altamente específicos (100%) (Araujo *et al.*, 2004).

Se han reportado la caracterización y disponibilidad de varios antígenos específicos de *M. tuberculosis* en el diagnóstico serológico, los cuales detectan por arriba del 85% de los casos de TB positivos por frotis pero la sensibilidad disminuye en los casos de TB con frotis negativo además de que la mayoría de los antígenos caracterizados tienen sensibilidad y especificidad más bajas en pacientes coinfectados con HIV (Weldingh *et al.*, 2005). Otros antígenos que han sido estudiados en pruebas serológicas son  $\alpha$  cristalin (Hsp X) MTB 48, Mtb81 y por último ESAT 6 y CFP 10, 38 Kda y 16 Kda; muchos de estos antígenos han demostrado buena sensibilidad y especificidad para identificar pacientes con TB pulmonar. En lo que respecta a isotipos de inmunoglobulinas la sensibilidad es mayor en las pruebas donde se mide IgG y es baja con IgA e IgM (Chan *et al.*, 2000).

En base a estudios recientes en relación a otros métodos de diagnóstico como son la utilización de la saliva para medir la IgA secretora contra antígenos de *M. tuberculosis*, y los hallazgos previos que obtuvimos del aumento de la sensibilidad con la combinación de 3 isotipos, incluyendo la IgAs anti-38kDa, se llevó a cabo el estudio de la reactividad de este isotipo responsable de la inmunidad en mucosas contra dos antígenos; PPD y 38kDa. El ensayo de ELISA utilizando IgAs anti-38kDa a diferencia de la IgAs anti-PPD, mostró alta reactividad en niños pacientes, fueran estos positivos o negativos a la prueba de la tuberculina o PPD, en comparación con los niños controles. Los resultados sugieren que estos 2 antígenos están asociados de manera diferentes con el desarrollo de la inmunidad de mucosas, la cual es mediada por IgAs (Fernández de Larrea *et al.*, 2006). Al igual que una prueba serológica, la utilización de IgAs a partir de la saliva sería un método diagnóstico ideal también porque es fácil y rápido de realizar y puede ser

implementado en áreas aisladas como sería el caso de las comunidades indígenas, donde el acceso a hospitales por estas personas se dificulta, esto después de que se realicen estudios con suficiente número de individuos que puedan validar las sensibilidades y especificidades de los métodos.

### **INMUNIDAD HUMORAL ESPECÍFICA EN ADULTOS**

En el contexto de encontrar un método de diagnóstico serológico ideal, fácil y rápido de realizar, se continuó con la búsqueda de un método a partir de suero de indígenas Warao y Criollos adultos. Se estudió en individuos con y sin infección por *M. tuberculosis*, la respuesta humoral específica de los isotipos; IgM, IgE, IgAs, IgG y las subclases de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3 contra el antígeno PPD. Los resultados mostraron que entre los indígenas Warao, la combinación de los isotipos IgG e IgE anti-PPD alcanzó una sensibilidad de 92%. Entre los Criollos, la combinación de los isotipos IgG1 e IgG2 anti-PPD mostró una sensibilidad de 90%; mientras que simples métodos fueron capaces de mostrar altas especificidades; IgG3 anti-PPD fue altamente específico (100%) entre los indígenas Warao e IgM anti-PPD alcanzó la especificidad de 97,4% entre los Criollos; los hallazgos muestran que métodos simples con un solo isotipo alcanzaron altas especificidades, mientras que métodos con la combinación de varios isotipos lograron aumentar la sensibilidad, lo cual podría ser una herramienta útil en el diagnóstico de TB (Araujo *et al.*, 2008).

### **INMUNIDAD CELULAR ESPECÍFICA: VACUNACIÓN**

Se ha estimado que el riesgo de desarrollar enfermedad después de la infección por *M. tuberculosis* es de 5-10% en adultos, 15% en adolescentes, 24% en niños entre 1 a 5 años y 43% en niños menores de 1 año (WHO, 2015). Estos estimados aunados a los primeros resultados que permitieron establecer que la prevalencia de TB infantil en niños Warao de 0 a 15 años era de 3,2%; equivalente a una altísima tasa de 3.190/100.000 niños (Fernández de Larrea *et al.*, 2002), nos llevó a pensar que se esperaba encontrar también casos de TB extrapulmonar; sin embargo, no fue lo que encontramos, los casos de TB

extrapulmonar no son frecuentes, lo cual pudiera estar relacionado con el hecho de que se ha reportado, que la vacunación con BCG protege contra estas formas de TB extrapulmonar. Esto nos llevó a plantearnos evaluar la respuesta inmunitaria celular; estudiamos el efecto de la vacuna BCG sobre la reactividad a la prueba de la tuberculina o PPD en niños indígenas Warao de comunidades con alta, media y baja prevalencia de TB; esto con la finalidad de establecer, si la vacunación afecta de manera importante la respuesta de inmunidad celular a la prueba de la tuberculina, pudiendo dar una respuesta de falso positivo a la infección por *M. tuberculosis* como ha sido publicado en la literatura.

En un total de 998 niños se estudió el valor diagnóstico de la infección latente mediante la prueba de la tuberculina o PPD, en niños indígenas vacunados no enfermos y no vacunados con BCG de comunidades que tienen una muy alta prevalencia de TB en adultos. Los resultados mostraron, que la vacunación con BCG no fue una importante causa de falsos positivos a la prueba de la tuberculina o PPD, excepto en comunidades con una baja prevalencia de infección activa o TB. Los resultados sugirieron que una historia de vacunación con BCG sobre la respuesta positiva al PPD después de 10 años de vacunación fue estadísticamente insignificante; y que en aquellas comunidades con una alta prevalencia de TB, una respuesta PPD positiva a una edad temprana refleja más probablemente el grado de exposición a casos de TB más que a la vacunación con BCG (Araujo *et al.*, 2008).

### **INMUNIDAD E INFECCIONES PARASITARIAS**

Humanos y parásitos han coevolucionado, y continúan coexistiendo. El entendimiento de las asociaciones huésped-parásito es esencial si queremos entender el impacto de los patógenos y enfermedades en la dinámica estabilidad de los indígenas Warao del delta venezolano.

En esta región, infecciones gastrointestinales representan una de las principales causas de morbilidad entre los indígenas, ellos tienen infecciones parasitarias recurrentes o abrumadoras,

especialmente por helmintos, donde la TB es también endémica.

El Instituto Nacional de Estadística (INE) en el año 2007, reportó el municipio Antonio Díaz, con el mayor número de casos de helmintiasis (52,3%) y amibiasis o infecciones por protozoarios (45,5%) (INE, 2007). Los parásitos, principalmente los helmintos, inducen el desarrollo de la respuesta de inmunidad celular del tipo Th2, la cual contrarresta el desarrollo óptimo de la respuesta del tipo Th1, esta última asociada a la resistencia de las infecciones por patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis*, causante de la TB. El reporte publicado por INE en el año 2007, nos condujo a desarrollar un estudio preliminar en relación con la prevalencia parasitológica presente en los indígenas Warao. Los resultados parasitológicos mostraron que, las helmintiasis estuvieron presentes en un 45,7% de los indígenas, seguidos de las parasitosis mixtas por helmintos y protozoarios en un 40%, y los protozoarios en un 5%; mientras que en un 7,5% de los individuos no se observaron parásitos. Entre los parásitos intestinales se observaron: *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis nana*; estos fueron los más frecuentes entre los helmintos, y *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Balantidium coli* entre los protozoarios (González *et al.*, 2003).

Los resultados en su conjunto muestran la existencia de una alta prevalencia de tanto infecciones por helmintos como de coinfecciones mixtas por helmintos y protozoarios, lo cual nos llevó a pensar que podría existir un perfil de expresión de citocinas tanto del tipo Th2 como Th1; pero con predominancia de Th2; lo cual se estableció en trabajos posteriores.

Infecciones debidas principalmente a parásitos helmintos están relacionadas con la respuesta humoral del isotipo IgE, la cual está asociada a la de inmunidad celular del tipo Th2. En un estudio exhaustivo, se evaluó la policlonalidad o IgE total así como las IgE e IgG4 específicas contra *M. tuberculosis* en indígenas Warao adultos y en Criollos adultos sin y con infección por *M. tuberculosis* (Araujo *et al.*, 2012).

Los resultados mostraron niveles significativos de IgE total presentes tanto en los pacientes como en los indígenas Warao controles en comparación con los pacientes y controles Criollos. La respuesta IgE específica mostró que; las reactividades IgE anti-PPD y anti-H37Rv fueron significativamente altas en los pacientes y controles indígenas Warao en comparación con los pacientes y controles Criollos. La reactividad de IgG4 anti-PPD y anti-H37Rv no mostró significancia entre los grupos; pero su reactividad se vio influenciada por el tratamiento anti tuberculoso. Los hallazgos comparativos de estas dos respuestas entre los individuos Warao y Criollos mostraron, que entre los indígenas Warao hay una intrínseca propensión a producir altos niveles de IgE total e IgE específica asociada a la de inmunidad celular del tipo Th2 en comparación con los individuos Criollos (Araujo *et al.*, 2012).

### **CITOCINAS E INMUNIDAD CELULAR**

En un estudio exhaustivo se evaluó la producción de citocinas; TNF- $\alpha$ , IL-12 (IL-12p40), IFN- $\gamma$  (tipo Th1) e IL-4 y también IL-5 (tipo Th2) en experimentos *ex vivo* realizados con células mononucleares de sangre periférica cultivadas de pacientes con TB y controles sanos de tanto indígenas Warao como de individuos Criollos, las cuales se estimularon con el antígeno purificado de cultivo o PPD de *M. tuberculosis* (Giampietro *et al.*, 2010). La detección de citocina se realizó a partir de los sobrenadantes de cultivo utilizando el ensayo de ELISA tipo sándwich. Los resultados mostraron que la producción de citocinas determinadas en sobrenadantes de cultivo a las 24 y 48 horas inducidas por el antígeno, podía dividirse en dos grupos; un grupo, el de los pacientes Criollos que producían preferencialmente y de manera significativa, la citocina pro inflamatoria, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), y las citocinas de tipo Th1; interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) tanto para las 24 como a las 48 horas de cultivo, y el otro grupo, el de los pacientes Warao que con preferencia producían citocinas del tipo Th2; la interleucina 4 (IL-4), pero de manera significativa la interleucina 5 (IL-5) tanto para las 24 como a las 48 horas de cultivo. Los hallazgos nos conllevan a pensar

que el desarrollo de una respuesta del tipo Th2 mediada por la IL-4 e IL-5 puede poner en minusvalía el desarrollo de la respuesta protectora contra *M. tuberculosis* del tipo Th1, lo cual conllevaría a poner en desventaja a los indígenas Warao para defenderse de la TB (Giampietro *et al.*, 2010).

### **FACTORES AMBIENTALES Y ANTROPOZOONÓISIS**

Los indígenas de las comunidades Warao del Delta venezolano desde muy temprana edad presentan altas tasas de infecciones parasitarias; por lo que el desarrollo de una respuesta principalmente del tipo Th2 desde la infancia pudiera ser un factor que favorece la susceptibilidad a la infección activa por *M. tuberculosis*. Existen además factores ambientales de riesgo que podrían predisponer a la contaminación con parásitos intestinales a través de las excretas de los animales que cohabitan con ellos, conduciendo esto al establecimiento de condiciones antrozoonóticas. Esto puede ser explicado debido a que los individuos utilizan el río Orinoco como fuente de agua para sus necesidades básicas; cuando el nivel freático del Orinoco desciende a causa de la marea, los cerdos y perros bajan a alimentarse de los restos orgánicos presentes en el suelo. Al subir la marea, los pobladores de la comunidad utilizan esta misma fuente de agua, lo que podría traer como consecuencia la contaminación accidental por huevos o quistes de parásitos intestinales, tales como: *Toxocara canis* y *Ascaris suum*, parásitos de perros y cerdos, respectivamente (Araujo *et al.*, 2015).

Se determinó por serología la seropositividad de infección por *Ascaris suum* y *Toxocara canis*, utilizando antígenos de excreción/secreción (E/S) de *Ascaris suum* (AES) y *Toxocara canis* (TES), tanto en indígenas Warao; adultos como niños pertenecientes a la comunidad de Murako, la cual tiene la peculiar característica de que los indígenas de esta comunidad conviven muy de cerca con perros, pero más especialmente con cerdos, los cuales son criados para venderlos. Los resultados mostraron que entre los adultos, 44,1% fueron seropositivos para ambos parásitos (*Ascaris suum* y *Toxocara canis*); mientras que los niños sólo mostraron seropositividad a uno u otro de los helmintos. Adicionalmente a partir de

células mononucleares de sangre periférica y utilizando la técnica de la PCR, se evaluó la respuesta inmune celular a través del estudio de la expresión de citocinas: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4. La cuantificación de la expresión de las citocinas mostró que hubo un significativo incremento de una respuesta inmunitaria celular tipo Th2, la cual estuvo mediada por el aumento de la expresión de IL-4 entre los indígenas con seropositividad para los antígenos TES provenientes de *Toxocara canis* (Araujo *et al.* 2015). Estos hallazgos podría sugerir que la alta incidencia de zoonosis de parasitosis intestinales podría ser un factor condicionante que favorezca la susceptibilidad a desarrollar TB activa en los individuos que habitan en estas comunidades.

## GENÉTICA E INMUNIDAD

No fue sino hasta después de 1930 que rigurosos estudios de gemelos proporcionaron fuerte evidencia de la contribución de la genética humana al estudio de la TB. La susceptibilidad Mendeliana a las enfermedades por micobacterias (SMEM) fue descrita por primera vez en 1951 por Mimouni y caracterizada desde 1996 (Ramírez, 2007). Los pacientes con SMEM son altamente susceptibles a micobacterias poco virulentas, pero son aparentemente resistentes a muchos otros agentes infecciosos, con excepción de *Salmonella*. Con el desarrollo de marcadores genéticos altamente polimórficos a partir de 1990, el concepto de genes principales fue aplicado a loci en los estudios de ligamiento de todo el genoma (Ramírez, 2007).

Los primeros resultados sobre factores genéticos que son determinantes importantes de la susceptibilidad a la TB fueron obtenidos con los antígenos del HLA clase II y la proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural, NRAM1 (SLC11A1), (Delgado *et al.* 2002). El estudio de la asociación de los polimorfismos genéticos que inciden en los niveles de expresión de las citocinas reguladoras o no reguladoras, permite concluir que diferentes alelos inciden de manera específica en el desarrollo de la susceptibilidad genética a la enfermedad; se ha reportado que la frecuencia de estos polimorfismos

varía en diferentes pueblos indígenas (Delgado *et al.*, 2002).

Se comenzó el estudio para la puesta en evidencia o no de la existencia de variaciones génicas o polimorfismos de citocinas asociadas a la resistencia o no a la infección por *M. tuberculosis*, conocimientos estos que permitirán con un mayor énfasis demostrar que los indígenas Warao, son una población sensible de padecer TB. Se estudió el Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual es una citocina importante para la resistencia a la infección por *M. tuberculosis*; por lo que las variantes génicas o polimorfismo del gen de IFN- $\gamma$  podrían estar asociadas con la susceptibilidad de los indígenas Warao a padecer TB. Se evaluaron las variantes o frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ +874) en 24 pacientes indígenas Warao con infección activa (TBA) por *M. tuberculosis* y 111 controles indígenas Warao (CTRL). Los resultados mostraron una significativa alta frecuencia del alelo A entre ambos grupos indígenas estudiados (homocigoto A/A mutante); TBA (95,8%) y CTRL (97,3%). Los indígenas portadores del genotipo homocigoto A/A mutante mostraron un incremento significativo de riesgo relativo de 3,59. La frecuencia genotípica de heterocigoto A/T fue de 4,16% para el grupo TBA y de 0,9% para el grupo CTRL. La frecuencia genotípica para T/T o silvestre también estuvo decrecida para el grupo CTRL (1,8%); esta frecuencia no se observó para el grupo TBA (Araujo *et al.* 2017). Adicionalmente se comparó las frecuencias genotípicas del polimorfismo IFN- $\gamma$ +874 de indígenas Warao controles con individuos controles caucásicos o mestizos americanos, los hallazgos en relación con los indígenas Warao homocigoto A/A mutante, mostraron una significativa alta frecuencia génica o genotípica A/A (97%) en comparación con los caucásicos (27%); mientras que entre los indígenas Warao se observó una disminución de las frecuencias genotípicas A/T(1,4%) y T/T (1,4%), en comparación con los Caucásicos; 53% y 20%, respectivamente (Araujo *et al.*, 2017). Hubo concordancia entre la alta frecuencia genotípica A/A mutante del polimorfismo IFN- $\gamma$ +874, la cual está asociada a la baja producción de IFN- $\gamma$  y la baja expresión de IFN- $\gamma$  cuantificada por

PCR tiempo real o qPCR (Araujo *et al.*, 2019). Se ha reportado que la identificación de polimorfismos en las regiones promotoras o de codificación de los genes de muchas citocinas y la demostración de que estos polimorfismos se asocian con los niveles de producción de las mismas con diferentes enfermedades, deben tomar en cuenta la heterogeneidad genética, la epistaxis, la estratificación de la muestra, la selección de casos y controles o las variaciones étnicas. Los polimorfismos en las regiones de regulación de los genes de citocinas pueden influenciar los niveles de transcripción del gen y han sido asociados con la susceptibilidad, y/o severidad de muchas enfermedades (Larcombe *et al.*, 2005).

Se ha postulado que la evolución del perfil de citocinas único pudiera estar asociada a la adaptación de los aborígenes a la presión selectiva relacionada con el ambiente en el cual predominaron las infecciones por hongos, parasíticas por protozoarios y helmínticas. Estudios sobre enfermedades infecciosas entre las poblaciones indígenas han sido enfocados en relación con factores socioeconómicos, contribuyendo estos a susceptibilidad o resistencia a las enfermedades, ejemplo de esto; el excesivo abuso del consumo de alcohol, la desnutrición, la pobreza, la cual es un marcador de TB. En la mayoría de estos estudios, las diferencias genéticas entre las poblaciones son anunciadas como factores contribuyentes en la susceptibilidad o resistencia a las enfermedades; sin embargo, las bases de esta disparidad o diferencias genéticas permanecen inexploradas (Larcombe *et al.*, 2005; Tollefson *et al.*, 2013; Praça Longhi *et al.*, 2013; Cormier *et al.*, 2019; Basta *et al.*, 2019). Razones estas, por la que seguimos investigando en este campo de la variación génica o polimorfismo de citocina y/o receptor que pudieran estar asociados a la alta susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* entre los indígenas Warao.

## **BIOMARCADORES Y DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS**

Los hallazgos previos en relación con optimizar el diagnóstico de la TB, nos convencieron de que debíamos continuar en el estudio de la respuesta inmunitaria humoral con la finalidad de desarrollar

métodos más económicos que ayudaran a mejorar la precisión diagnóstica de la TB en la población indígena Warao; tanto en adultos y niños con métodos con altas sensibilidades y especificidades de manera de poder realizar un diagnóstico serológico rápido de TB, especialmente en aquellos casos que son baciloscopia negativos.

El equipo de la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas en México con la que tenemos una cooperación científica, en hallazgos previos con humanos del análisis del Transcriptoma mediante el uso de la plataforma GeneSpring® (Agilent®, USA), mostraron la selección de 108 genes relacionados con la respuesta inmune innata que discriminan entre individuos con infección latente, con respecto a individuos con TB activa, usando individuos sanos como grupo control (Lopez *et al.*, 2018); sin embargo, se seleccionaron 10 genes por su capacidad de expresarse a nivel de proteínas en suero mostraron altos niveles de sensibilidad y especificidad en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa o PCR tiempo real o qPCR, y en particular, cuatro de ellos; uPAR, sCD14, MMP-9 y CXCL9/MIG, mediante ensayos de ELISA, fueron capaces de diferenciar las muestras de suero de enfermos, de las de sujetos sanos, demostrando que estas moléculas son buenos candidatos a biomarcadores para diagnosticar TB activa en suero de humanos o por poner en evidencia la expresión génica de estos genes (Lopez *et al.*, 2018).

Se llevó a cabo un estudio que con la finalidad de encontrar herramientas rápidas y útiles para el diagnóstico de TB, y utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa o PCR en tiempo real (qPCR), se evaluó la expresión relativa de biomarcadores de la respuesta de inmunidad innata como; Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Receptor para endotoxina (lipopolisacárido) soluble (CD14s), Metaloproteinasa de matriz o gelatinasa B (MMP-9), Receptor CC5, el cual reconoce quimiocinas CXC tales como MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MIP-1 $\beta$  (CCR5), Eotaxin, quimiocina CC involucrada en la señalización a través del receptor CCR3 (CCL11), Monocina humana inducida por IFN- $\gamma$  (CXCL9/MIG) y Receptor activador del plasminogeno tipo urokinasa (uPAR/PLAUR).

A partir de células de sangre periférica de indígenas Warao en condiciones de estimulación (E) con una mezcla antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP10, y TB7.7), y en condiciones sin estimulación (NE), con la finalidad de determinar el poder discriminatorio de estos biomarcadores entre los grupos de: Casos de indígenas Warao con infección activa por *M. tuberculosis* (TBA), indígenas con infección latente (TBL) e indígenas controles no infectados (CTRL). Los resultados de las medianas e Inter Quartile Ranges (IQR) de la expresión génica relativa de los biomarcadores mostraron, niveles significativamente altos de MMP9 entre los grupos TBL-NE y TBL-E en comparación con los grupos CTRL-NE y CTRL-E; mientras que niveles significativamente bajos de CCR5 fueron encontrados en el grupo TBL-E en comparación con ambos grupos controles; CTRL-NE y CTRL-E. Se observaron niveles significativamente bajos CCL11 en el grupo TBL-E en comparación con el grupo CTRL-NE. Los hallazgos mostraron que el biomarcador MMP9 tiene poder discriminatorio de diagnóstico entre los indígenas TBL y los CTRL; mientras que CCR5, CCL11, CD14 e IFN- $\gamma$  no diferencian los indígenas Warao con infección activa por *M. tuberculosis* (TBA) o latente (TBL) de los indígenas no infectados (CTRL).

El MMP9 como un potencial biomarcador de la detección de casos de infección latente puede ser útil para detectar los casos nuevos de infección en las comunidades endémicas Warao con alto riesgo de desarrollar TB (Araujo *et al.*, 2019). La identificación de biomarcadores y la demostración de que estos se asocian con los niveles de producción de los mismos en diferentes enfermedades deben tomar en cuenta la heterogeneidad genética, la cual existe entre los pueblos indígenas. En este contexto, entre los hallazgos encontrados en la población mexicana, en comparación con los indígenas Warao, se evidenció diferencias en los resultados; el biomarcador MMP9 mostró tener poder discriminatorio de diagnóstico entre los indígenas Warao TBL y los CTRL; mientras que para la población mexicana, este biomarcador junto con uPAR, sCD14, y CXCL9/MIG fueron capaces

de diferenciar enfermos con TB, de un grupo infectados por *M. tuberculosis* con infección latente o de sujetos sanos (Araujo *et al.*, 2019).

Seguimos en la búsqueda de encontrar métodos serológicos con alta precisión diagnóstica de TB entre los indígenas Warao; con ese fin, estamos desarrollando con el Dr. Manuel Alfonso Patarroyo de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia en Bogotá (FIDIC), métodos serológicos utilizando péptidos sintéticos de dos antígenos del bacilo *M. tuberculosis*; 5 péptidos del antígeno ESAT-6 y 17 péptidos del componente A del antígeno 85 (Ag85A).

## CONCLUSIONES

De manera resumida se muestran los resultados obtenidos que nos han permitido avanzar, entender y conocer que existen factores determinantes de riesgo tanto inmunogenéticos como ambientales que están contribuyendo a que permanezca una alta prevalencia de TB entre los indígenas del pueblo Warao. El interés de establecer y dar a conocer estos factores determinantes de riesgo, está en el hecho de que las autoridades de salud central y local se sientan motivadas a tomar las medidas necesarias para mejorar el control de la TB entre estas comunidades indígenas. Estas investigaciones pueden ayudar a mejorar la calidad de vida de los indígenas Warao, si se toman medidas preventivas como la educación comunitaria en salud; e intervenciones necesarias, como son las de realizar pesquisas activas de casos con los métodos tradicionales, microbiológico, clínico y epidemiológico; pero también con métodos adicionales, suficientemente sensibles y específicos, así como rápidos, que puedan garantizar el corte de la transmisión de la infección. La obtención de financiamiento para investigación en salud del pueblo Warao, redundaría en mejorar los niveles de salud y calidad de vida, que les permita impulsar libremente su destino social y político, para garantizar la supervivencia de las actuales y futuras generaciones.

Finalmente, como recomienda la Organización Mundial de la Salud en estrategias para terminar con la TB. Para el control de los factores determinantes de

la TB, es necesario considerar no solamente las políticas establecidas y los sistemas de protección, sino también tomar acciones sobre la protección en salud y la reducción de la pobreza. Esta combinación puede incidir en la disminución de inequidades en salud y la carga de TB entre los indígenas del mundo (WHO, 2015).

## REFERENCIAS

- ARAUJO Z., FERNÁNDEZ DE LARREA C., LÓPEZ D., FANDIÑO C., CHIRINOS M., CONVIT J., DEBORA I., DE WAARD J., (2003). "Hematologic values among Warao indians with tuberculosis from the Orinoco delta of Venezuela". *Acta Científica Venezolana* 54(4): 204-210.
- ARAUJO Z., DE WAARD J.H., FERNÁNDEZ DE LARREA C., LÓPEZ D., SINGH M., OTTENHOFF T.H.M., AREND S.M., CONVIT J. (2004). "Study of the Antibody Response against *M. tuberculosis* Antigens in Warao Amerindian Children in Venezuela". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(5): 517-524.
- ARAUJO Z., GONZÁLEZ N., DE CUBEDDU L., ZIEGLER R.C., DE WAARD J.H., PUJOL F.H., CARRASCO DE SERRANO N., GARCÍA DE SABOIN A. (2006). "Levels of Complement C3 and C4 Components in Amerindians living in an Area with High Prevalence of Tuberculosis". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 01(4): 359-364.
- ARAUJO Z., DE WAARD J.H., FERNÁNDEZ DE LARREA C., BORGES R., CONVIT J. (2008). "The effect of Bacille Calmette-Guérin vaccine on tuberculin reactivity in indigenous children from communities with high prevalence of tuberculosis". *Vaccine* 26(44): 5575-5581.
- ARAUJO Z., GIAMPIETRO F., CASTELLANO CANÇADO L., SINGH M., WIDE A. (2008). "Comparison of serological responses in two different populations with pulmonary tuberculosis". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103(7): 661-667.
- ARAUJO Z., GIAMPIETRO F., RIVAS-SANTIAGO B., LUNA J., WIDE A., CLARK W., DE WAARD J.H. (2012). "Patients exposed to *M. tuberculosis* infection with a prominent IgE response". *Archives of Medical Research* 43: 225-232.
- ARAUJO Z., BRANDES S., PINELLI E., BOCHICHIO M.A., PALACIOS A., WIDE A., RIVAS SANTIAGO B., JIMÉNEZ J.C. (2015). "Seropositivity for ascariasis and toxocarosis and cytokine expression among the indigenous people in the Venezuelan Delta region". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57(1): 47-55.
- ARAUJO Z., PALACIOS A., BIOMÓN R., RIVAS SANTIAGO B., WIDE A., JIMÉNEZ J.C., FERNÁNDEZ DE LARREA C., ENCISO MORENO J.A. (2017). "Concordance between interferon- $\gamma$  gene +874A/T polymorphism and interferon- $\gamma$  expression in a TB-endemic indigenous setting". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50(2): 199-207.
- ARAUJO Z., PALACIOS A., ENCISO MORENO L., LOPEZ RAMOS J.E., WIDE A., DE WAARD J.H., ENCISO MORENO J.A. (2019). "Evaluation of the transcriptional immune biomarkers in peripheral blood from Warao indigenous associate with the infection by *M. tuberculosis*". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 52: e20180516.
- AYALA C., WILBERT W. (2012). "Gente de la curiara: Los Warao un pueblo indígena de caños y humedales. Fundación La Salle de Ciencias Naturales", Instituto Caribe de Antropología y Sociología, Vol. 2, Caracas.
- BARRETO D., MOSONYI E.E. (1980). "Literatura Warao". Fuente: [http://www.gobiernoonlinea.ve/venezuela/perfil\\_historia6\\_1.html](http://www.gobiernoonlinea.ve/venezuela/perfil_historia6_1.html).
- BASTA P.C., DE SOUSA VIANA P.V. (2019). "Determinants of tuberculosis in Indigenous people worldwide". *The Lancet* 7: e6-7.
- BRIGGS C., MANTINI BRIGGS C. (2004). "Las historias en los tiempos del cólera". Editorial Nueva Sociedad, Caracas.
- CHAN E.D., HEIFETS L., ISEMAN M.D. (2000). "Immunologic diagnosis of tuberculosis: A review". *Tubercle Lung Diseases* 80: 131-40.
- CORMIER M., SCHWARTZMAN K., N'DIAYE D.S., BOONE C.E., DOS SANTOS A.M., GASPARD J., CAZABON D., GHIASI M., KAHN R., UPPAL A., MORRIS M., OXLADE O., (2019). "Proximate determinants of tuberculosis in indigenous people worldwide: a systematic review". *Lancet Global Health* 7: e68-80.
- DE WAARD J., DEL NOGAL B., CHANG S., HURTADO J.L., INOJOSA H.G., (2017). "Factores de riesgo para infección por VIH en indígenas de la etnia Warao del Municipio Antonio Díaz, Estado Delta Amacuro, Venezuela. Octubre - diciembre 2015". *Boletín Venezolano de Infectología* 28(1): 55-65.
- DELGADO J., BAENA A., THIM S., GOLDFELD A., (2002). "Ethnic specific genetic associations with pulmonary tuberculosis". *Journal Infection Diseases* 186: 1463-8.
- FERNÁNDEZ DE LARREA C., DE WAARD J.H., GIAMPIETRO F., ARAUJO Z., (2006). "The secretory immunoglobulin A response to *M. tuberculosis* in a childhood population". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(5): 456-461.

- FERNÁNDEZ DE LARREA C., FANDIÑO C., LÓPEZ D., DEL NOGAL B., RODRÍGUEZ N., CONVIT J., ARAUJO Z., DE WAARD J., (2002). "Tuberculosis en menores de 15 años en la población Warao de Venezuela". *Investigación Clínica* 43: 35-48.
- FREIRE, G., (2007). "Introducción, en Salud Indígena en Venezuela. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Dirección del Salud Indígena", Caracas. Vol. 1: 11-17.
- GARCIA-CASTRO A., (2018). "Los Warao en Brasil son refugiados, no inmigrantes. Cuestiones etnográficas y etnohistóricas". *Périplos* 2(2): 32-58.
- GIAMPIETRO F., DE WAARD J.H., RIVAS SANTIAGO B., ENCISO MORENO J.A., SALGADO A., ARAUJO Z., (2010). "In vitro levels of cytokines in response to purified protein derivative (PPD) antigen in a population with high prevalence of pulmonary tuberculosis". *Human Immunology* 71(11): 1099-1104.
- GONZÁLEZ N., DE CUBEDDU L., DE WAARD J.H., PUJOL F.H., CASTÉS M., ARAUJO Z., (2003). "Study of the immune response in Warao children from an area with high prevalence of tuberculosis". *Investigación Clínica* 44(4): 303-318.
- INE., (2007). "Población Indígena por Entidad Federal. Tasa bruta de mortalidad corregida, según entidad federal, 2002-2007". Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.gov.ve>.
- INE., (2011). "Informe Final – Censo Nacional 2011". Instituto Nacional de Estadística. Caracas. <http://www.ine.gov.ve>.
- INE., (2015). "Censo Nacional de Población y Vivienda 2011". Empadronamiento de la Población Indígena. República Bolivariana de Venezuela, Ministerio del Poder Popular de Planificación, Instituto Nacional de Estadística, Caracas.
- INE., (2018). "Venezuela - Estados Bolívar, Delta Amacuro, Monagas, Sucre. Censo 2011". Lista de centros poblados con población declarada warao. Documento inédito (libro en formato Excel), Instituto Nacional de Estadística, Caracas.
- LARCOMBE L., REMPEL J.D., DEMBINSKI I.J., TINCKAM K., RIGATTO C., NICKERSON P., (2005). "Differential cytokine genotype frequencies among Canadian Aboriginal and Caucasian populations". *Genes Immunity* 6(2): 140-4.
- LAYRISSE Z., HEINEN H.D., BALBAS O., GARCÍA E., STOIKOW Z., (1988). "Unique HLA-DR/DQ associations revealed by family studies in Warao Amerindians. Haplotype and homozygosity frequencies". *Human Immunology* 23: 45-57.
- LOPEZ RAMOS J.E., MACIAS SEGURA N., CUEVAS CORDOBA B., ARAUJO GARCIA Z., BASTIAN Y., SALINAS E., ENCISO MORENO J.A., (2018). "Improvement in the diagnosis of tuberculosis combining M. tuberculosis immunodominant peptides and serum host biomarkers". *Archives of Medical Research* doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.07.003.
- MAKHATADZE N.J., FRANCO M.T., LAYRISSE Z., (1997). "HLA class I and class II allele and haplotype distribution in the Venezuelan population". *Human Immunology* 55: 53-58.
- MAY J.J., KATILUS J., HENSON P.M., DREISIN R.B., (1983). "The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis". *American Review Respiratory Diseases* 128: 920-925.
- MONTENEGRO, R.A., STEPHENS, C., (2006). "Indigenous Health part 2: Indigenous health in Latin America and the Caribbean". *Lancet* 367: 1859-1869.
- MPPS., (2007). "Evaluación del programa nacional de control de la tuberculosis año 2007". Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas-Venezuela.
- MPPS., (2015-2017). "Servicio de Atención y Orientación al Indígena (SAOI). Pacientes atendidos por el Servicio de Atención y Orientación al Indígena". Ministerio del Poder Popular para la Salud, Tucupita.
- MPPS., (2015a, 2005b). "Anuario de morbilidad y mortalidad año 2013". Ministerio del Poder Popular para la Salud, Dirección General de Epidemiología, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, Caracas.
- MPPS., (2018). "Programa Nacional Integrado de Control de la TB. Tuberculosis en población indígena Warao. Venezuela 2012 – 2017". Dirección General de Programas de Salud. Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas.
- MSAS., (1999). "Seminario Técnico-Administrativo. Programa Integrado de Control de la Tuberculosis". Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Caracas-Venezuela.
- MSDS., (2006). "Evaluación del programa nacional de control de la tuberculosis año 2006". Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Caracas-Venezuela.
- PRAÇA LONGHI M.R., MARQUES ZEMBRZUSKI V., BASTA P.C., CRODA J., (2013). "Genetic Polymorphism and immune response to tuberculosis in indigenous populations: a brief review". *Brazilian Journal Infection Diseases* 17: 363-368.
- RAMÍREZ M.C.D., (2007). "Bases genéticas de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas humanas". *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 38: 1-16.

- RIVAS-SANTIAGO B., VIEYRA-REYES P., ARAUJO Z., (2005). "Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar". *Investigación Clínica* 46(4): 391-412.
- TOLLEFSON D., BLOSS E., FANNING A., REDD J.T., BARKER K., MCCRAY E., (2013). "Burden of tuberculosis in indigenous peoples globally: a systematic review". *International Journal Tubercle Lung Diseases* 17(9): 1139-1150.
- VILLALBA J.A., BELLO G., MAES M., SULBARAN Y.F., GARZARO D., LOUREIRO C.L., RANGEL H.R., De WAARD J.H., PUJOL F.H., (2013). "HIV-1 epidemic in Warao Amerindians from Venezuela: spatial phylodynamics and epidemiological patterns". *AIDS* 27(11): 1783-1791.
- WELDINGH K., ROSENKRANDS I., MENG OKKELS L., DOHERTY T.M., ANDERSEN P., (2005). "Assessing the serodiagnostic potential of 35 *M. tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens". *Journal Clinical Microbiology* 43: 57-65.
- WHO., (2015). "Global tuberculosis report". *World Health Organization, Geneva. ISBN 978 924 156505 9.*

## AGRADECIMIENTOS

Para llevar a cabo las investigaciones necesitábamos de fuentes de financiamiento, las cuales fueron obtenidas de diferentes entidades gubernamentales y no gubernamentales, nacionales e internacionales, como son: Banco Mundial, Ministerio de Ciencia y Tecnología/Banco Interamericano de Desarrollo (FONACIT/BID), Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV), Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Banco PARIBAS de Francia, Erickson, C.A y BIOCHROM, C.A. El agradecimiento se extiende a los funcionarios de salud del Programa de Control Regional de Tuberculosis de Delta Amacuro, el Hospital "Dr. Luis Razetti" de Túcupita, estado Delta Amacuro, Gobernación del estado Delta Amacuro, Alcaldías de los Municipios visitados, enfermeros y enfermeras de los ambulatorios existentes en ciertas comunidades. A los no funcionarios como: estudiantes de la Cátedra de Salud Pública, Escuela de Medicina "José María Vargas" de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, colaboradores científicos de Instituciones Nacionales e Internacionales, y muy especialmente a los indígenas Warao participantes y no participantes

de los estudios, a los traductores de la lengua Warao/ español, a todos ellos por su calidez humana y por habernos aceptado en sus comunidades.

El reto continúa y para llevar a cabo las investigaciones en curso, seguiremos necesitando de recursos financieros y de voluntades políticas que nos garanticen la continuidad de las mismas.

# Laboratorio de tuberculosis, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit"; 20 años de diagnóstico e investigación

**Franklin Ennodio Claro Almea<sup>1</sup>**  
frank241293@gmail.com

**Douglas Alexander Silva Duarte<sup>1</sup>**  
douglasasd187@gmail.com

**Jacobus H. De Waard<sup>1</sup>**  
jacobusdeward@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0003-4118-1015>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Universidad Central de Venezuela  
- Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

El Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, se activó desde el año 1996, está enfocado al diagnóstico, la docencia e investigación. Se atiende al público en general y a los pacientes del Hospital Vargas para descartar Tuberculosis pulmonar, extra-pulmonar y la Micobacteriosis. Se capacitan al personal de bioanálisis y microbiólogos en las técnicas del diagnóstico, se reciben estudiantes nacionales e internacionales de medicina, biología y bioanálisis para elaboración de tesis de pre y postgrado y conjuntamente se realizan sus respectivas investigaciones. Más de 100 publicaciones internacionales reflejan estas investigaciones. Además, en conjunto con los estudiantes del último año de la Escuela de Medicina Dr. José María Vargas de la Universidad Central de Venezuela, atendemos poblaciones rurales, sobre todo el pueblo indígena Warao, del Delta Amacuro. El presente trabajo es un resumen de la situación actual de TB en Venezuela, las actividades de diagnóstico del Laboratorio y las investigaciones ejecutadas en los últimos 20 años.

**Palabras clave:** Tuberculosis; Micobacteriosis; diagnóstico; adenosina deaminasa; incidencia; investigación operacional; Venezuela.

## THE LABORATORY OF TUBERCULOSIS AT THE "INSTITUTO DE BIOMEDICINA "DR. JACINTO CONVIT"; 20 YEARS OF DIAGNOSIS AND INVESTIGATION

### ABSTRACT

The Laboratory of Tuberculosis at the "Instituto de Biomedicina" is active since 1996 and focused on diagnosis, teaching and research, specially in Tuberculosis and Mycobacteriosis. Access to the lab is for the general public and patients hospitalized in Hospital Vargas. In addition, the department provides training for

bioanalysts and microbiologists in diagnostic techniques. National and international medicine students, biology and biochemistry students prepare their pre- and postgraduate thesis and conduct research in the laboratory. More than 100 publications show the results of this research. Moreover, together with the medical students of the “Escuela de Medicina Dr. José María Vargas” of the Universidad Central de Venezuela, the laboratory attends the Warao people in the State of Delta Amacuro. The current review is a summary of the actual situation of TB in Venezuela, the diagnostic activities of the Laboratory and also a summary of the investigation carried out in the last 20 years.

**Keywords:** Tuberculosis; Mycobacteriosis; diagnosis; adenosine deaminase; incidence; operational research; Venezuela.

## INTRODUCCION

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por el *Mycobacterium tuberculosis*. Es una enfermedad con una morbilidad y mortalidad considerable y representa una amenaza a la salud pública mundial y nacional. El Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” fue creado en 1996 con un aporte del Banco Mundial como una herramienta de apoyo asistencial en el diagnóstico e investigación para la lucha contra la TB. Actualmente es uno de los laboratorios que lidera el diagnóstico de la enfermedad en la región central del país.

El laboratorio consta de dos líneas de trabajo complementarias entre sí. La primera corresponde al diagnóstico de TB y la segunda al diagnóstico de micobacteriosis, definido como infecciones producidas por mico bacterias atípicas. Además, el laboratorio tiene carácter de docencia y se reciben estudiantes que deseen realizar pasantías o investigaciones para su trabajo especial de grado. Desde su fundación, se dedicaba mayormente a la investigación más que al área asistencial por la poca afluencia de pacientes.

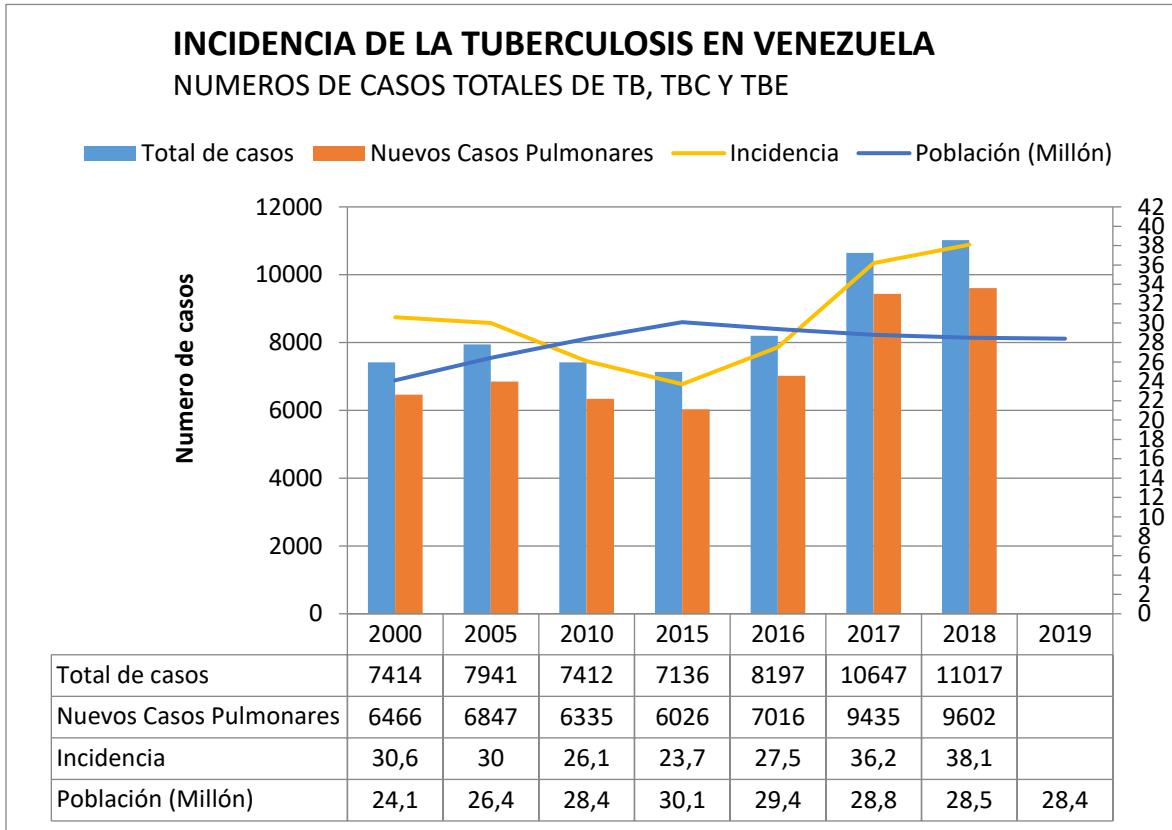
Los libros de diagnóstico muestran que en el año 2002 solamente se recibieron aproximadamente 1650

pacientes para descartar TB. Sin embargo, con el pasar de los años la afluencia de pacientes se fue incrementando y en el año 2019 recibimos más de 5500 pacientes para descartar TB. Consecuentemente el diagnóstico consume más tiempo y la investigación paso al segundo plano por falta de personal. En el presente trabajo se describirá la situación de la TB durante el periodo 2015-2019, la experiencia y técnicas en el manejo del diagnóstico de la TB en el laboratorio. Adicionalmente se discute brevemente las publicaciones más importantes del laboratorio en las cuales se reflejan las otras actividades como el diagnóstico y la investigación en micobacteriosis, la atención primaria y la investigación en poblaciones indígenas. Es importante subrayar que la investigación que se desarrolla en el laboratorio es de tipo operacional; investigación que apoya a reconocer un problema de salud y busca una solución.

## EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

La TB representa un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 10 millones (9-11 millones) de personas se enfermaron de TB en 2018 con una morbilidad que se sitúa a nivel mundial de 130 casos por cada 100.000 habitantes. Además, se estima que en el mismo año 1,2 millones (intervalo de 1.1-1.3 millones) de personas murieron por TB entre personas VIH negativas y otras 251.000 muertes (intervalo 223.000-281.000) entre personas VIH positivas (WHO, 2019).

Las estrategias más importantes para controlar la TB, es la detección temprana y el apropiado tratamiento de casos infecciosos, para así romper la cadena de transmisión. Tanto a nivel internacional como nacional es el diagnóstico temprano en el cual los países están fallando. Se estima que solamente diagnosticamos el 70% de los casos nuevos a nivel mundial y alrededor de un 30 % de los casos de TB incidente no son detectados. Esto deja una brecha de aproximadamente 3 millones de personas con TB alrededor del mundo sin un diagnóstico. Este sub-diagnóstico es considerable y deja la enfermedad sin control. Esto se debe principalmente a la deficiencia en el diagnóstico de TB en los laboratorios. Los

**Figura 1.** Número de casos totales de TB, TB pulmonar y TB extrapulmonar (casos total – casos pulmonar) reportados por la OMS para Venezuela

laboratorios están sobrecargado de trabajo, mal equipados, el personal no está bien capacitado y /o no utilizan las técnicas adecuadas.

### **TUBERCULOSIS EN VENEZUELA**

En Venezuela, el deterioro de las condiciones socioeconómicas y la deficiencia en los programas de control han favorecido el incremento de la TB. Según datos reportados por la OMS la incidencia de TB en Venezuela estaba bajando desde 1993 hasta 2015 con un mínimo histórico en el año 2015 con 7136 nuevos casos y una incidencia de 23,7 casos por cada 100.000 habitantes. A partir de este año hay un repunte y en el año 2018 hubo 11.017 nuevos casos registrados, con un incremento del 55 % y con una incidencia de 38,1 casos por cada 100.000 habitantes (WHO, 2020). Esta tendencia indica un empeoramiento progresivo en el manejo de la TB en el país (figura 1). El repunte probablemente está relacionado con el comienzo de la recesión económica en el año 2013, que condujo a

problemas socio-económicos y sanitarios, y consecuentemente en un incremento de la pobreza; es claramente conocido que la TB se encuentra asociada a la pobreza.

### **EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN EL INSTITUTO DE BIOMEDICINA "DR. JACINTO CONVIT"**

El diagnóstico mínimo de la TB que exige la WHO para los laboratorios son la baciloscopia (BK) y el cultivo (De Waard *et al.*, 2007; Terán *et al.*, 2015). Para el diagnóstico no usamos técnicas moleculares.

#### **Baciloscopia (BK)**

Es la coloración de Zielh-Neelsen de un esputo de un paciente sospechoso de TB y posteriormente la detección de las micobacterias con el microscopio; la base de detección de TB desde hace más de 100 años, y actualmente aún es el estudio principal en sitios con presupuestos limitados.

## **El cultivo**

Sigue siendo la prueba “Gold estándar” para el diagnóstico de TB. El cultivo permite detectar a pacientes con TB de baja carga micobacteriana, teniendo un límite de detección de 100 bacilos/ml de muestra, además permite estudiar la fármaco resistencia, aislar micobacterias atípicas y la epidemiología molecular.

Es importante subrayar que la baciloscopía no diferencia entre las especies de micobacterias que se pueden dividir en dos grandes grupos; las del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales causan TB y las micobacterias atípicas que también infestan al pulmón y tejido blando, causando lo que llamamos “Micobacteriosis”. Para esta diferenciación se necesita el cultivo. El procedimiento más utilizado para cultivar muestras clínicas es el método de Petroff que consiste en la digestión y descontaminación de muestras de esputo para posteriormente sembrarla en medios de cultivo. No obstante, es un método engorroso, que requiere más de 30 minutos de centrifugación y realizar el procedimiento en una cabina de bioseguridad con un personal técnicamente calificado.

Es por ello, que en el laboratorio se utiliza el método de Kudoh, un método alternativo, rápido que dura aproximadamente 3 minutos en el procesamiento. La evaluación de ambos métodos, demostró que el método de Kudoh es tan sensible como el método de Petroff, y por lo tanto representa una alternativa valiosa para el proceso de digestión-descontaminación en el diagnóstico de TB pulmonar (Jaspe *et al.*, 2009). Este método permite procesar diariamente cualquier cantidad de muestras.

Usamos medios sólidos a base de huevo para sembrar muestras clínicas.

## **Determinación de la Actividad de Adenosina Deaminasa (ADA).**

Para el diagnóstico de formas extra-pulmonar (TBE) como la TB pleural, meníngea, pericárdica y peritoneal, usamos la determinación de la actividad de la enzima adenosina deaminasa (ADA) en los líquidos biológicos; una prueba rápida, de bajo costo, con una alta sensibilidad y especificidad. Recibimos una variedad de líquidos como: cefalorraquídeo, pleural, ascítico y

pericárdico. El ADA suele aumentar en pacientes con TB. En el laboratorio se realizó un estudio que determinó, una sensibilidad y especificidad de 89% y 85% respectivamente para el diagnóstico de TB pleural, obteniendo resultados similares a estudios internacionales, y soportando así esta prueba como una herramienta diagnóstica alternativa de TB pleural. Para aumentar la capacidad diagnóstica del ADA, esta determinación se integra a un algoritmo que toma en cuenta la clínica, el citotímico y citomorfológico del líquido biológico, conllevando esto casi en su totalidad, a un diagnóstico definitivo.

## **La prueba intradérmica de tuberculina**

Consiste en colocar una inyección intradérmica de derivado proteico purificado (PPD) en la parte anterior del antebrazo, y si ha habido exposición al microorganismo, se desarrollará una reacción de hipersensibilidad retardada y aparecerá una induración a las 48-72 horas. Esta prueba presenta limitaciones ya que no discrimina entre una infección latente de una infección activa. Sin embargo, la usamos para detectar la infección latente en pacientes que por inmunosupresión (inducido) necesitan quimioprofilaxis para evitar el desarrollo de una infección activa. Anualmente ponemos unas 1.000 dosis de PPD a pacientes VIH positivos y pacientes de Dermatología que están entrando en un tratamiento con inmunosupresores por largo tiempo por ejemplo por sufrir de psoriasis. El laboratorio produce PPD para el control de TB en el ganado. Como se sabe, la TB es una zoonosis y el bovino puede estar infectado con *M. bovis*. La detección de esta infección es por medio del uso de tuberculina PPD bovina.

## **Métodos de biología molecular en el laboratorio**

Las micobacterias que se aíslan en el laboratorio se les aplica biología molecular. La identificación de las micobacterias de complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y BCG) se basa en determinar la presencia o ausencia de regiones de diferencias en el cromosoma de las micobacterias con una simple PCR de punto final. Las micobacterias atípicas se identifican con una técnica llamada PRA, que involucra una PCR como primer paso seguido del uso

de enzimas de restricción sobre el fragmento que fue amplificado y posteriormente el análisis de los fragmentos resultantes. Las técnicas como IS6110 fingerprinting, MIRU-VNTR y spoligotyping se usan para estudiar la epidemiología molecular de la TB (de Waard *et al.*, 2007; Terán *et al.*, 2015).

### **EL APORTE DEL LABORATORIO DE TUBERCULOSIS COMO CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL EN EL DIAGNÓSTICO DE TB**

Desde los últimos años, el laboratorio ha representado un rol protagónico en el diagnóstico de TB en la región central del país (Distrito Capital y estado Miranda) debido a la disminución de los servicios de diagnóstico por parte de la red pública sanitaria y el aumento de casos en el país.

En el Laboratorio de Tuberculosis durante el periodo 2016-2019 se han procesado 20.585 muestras de pacientes con TB a descartar, de los cuales 6578 pacientes han sido diagnosticados con TB por BK y/o cultivo o ADA. El laboratorio en el año 2018 diagnosticó aproximadamente el 52,8% de los casos en la región central y 15,39 % de la TB a nivel nacional. Los datos del laboratorio y el Programa Nacional de Control de Tuberculosis en los diagnósticos de TB extra-pulmonar registrados en DC y el estado Miranda en el 2018 nos enseñan que una parte importante (un 57%) de la TB extra-pulmonar que diagnosticamos no está registrado en el Programa Nacional de Control de Tuberculosis (tabla 1). Probablemente estos pacientes están registrados como TB pulmonar o no reciben tratamiento a pesar de ser diagnosticados. La mayoría son casos de pleuritis tuberculosa (TB pleural). Esta diferencia de registro está en investigación.

### **Micobacteriosis**

Adicionalmente al diagnóstico de TB cada año recibimos unos 400 pacientes con sospecha de una infección con micobacterias atípicas y aislamos unas 150 micobacterias. Los pacientes son referidos sobre todo por el servicio de Dermatología provenientes de casos de infecciones en tejido blando posterior a trauma o intervenciones quirúrgicas (cirugía plástica). Todos los aislamientos se identifican a nivel de

especies para poder iniciar un tratamiento especie específico.

Para la identificación usamos técnicas de biología molecular, se realiza PCR para amplificar un fragmento específico del genoma de las micobacterias atípicas y enzimas de restricción para determinar un polimorfismo en este fragmento, lo cual permite la identificación.

### **RECOMENDACIONES PARA EL FORTALECIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS Y LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO**

En los últimos años el laboratorio ha tenido déficits en personal y equipamiento. La crisis económica no ha permitido que el laboratorio pueda actualizarse y trabajar al 100% y en acuerdo con las recomendaciones de la WHO. El laboratorio realiza una parte importante del diagnóstico de TB y Micobacteriosis en el país, y es por ello la importancia del mejoramiento de los métodos, equipos y capacitación del personal. A continuación se describen la situación actual del laboratorio y la recomendación para el fortalecimiento del diagnóstico en el mismo.

### **Microscopia**

Actualmente contamos con microscopia convencional. Para el diagnóstico de TB la WHO recomienda el uso de un microscopio fluorescente para aumentar la sensibilidad del diagnóstico.

### **Pruebas de resistencia**

Deberían ser pruebas de rutina para todos los pacientes con un cultivo positivo. Sin embargo, el laboratorio no las realiza. Para estas pruebas se usan equipo llamado Gene Expert, que determina la resistencia a rifampicina, una droga clave en el tratamiento e indicador de resistencia multidroga. Hay una necesidad urgente de que este tipo de equipo sea incorporado al laboratorio y así aumentar aún más la capacidad diagnóstica.

**Tabla 1.** Casos totales de TBP y TBE. Se muestra el total de casos reportados en Venezuela durante el período de estudio, en los estados Miranda y Distrito Capital. Además, se presentan los casos reportados por el laboratorio.

Casos de TB en Venezuela			Casos de TB en DC y Edo Miranda			Casos del Laboratorio de Tuberculosis			
Año	TBP	TBE	Total de casos	TBP	TBE	Total de casos	TBP	TBE	Total de casos
2016	7016	1181	8197	1795	501	2296	432	747	1179
2017	9435	1212	10647	2241	536	2777	906	798	1704
2018	9602	1415	11017	2516	691	3207	610	1086	1696
2019	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	909	1090	1999

### Cultivos líquidos

En la actualidad en otros países, los medios sólidos fueron desplazados por medios líquidos, los cuales brindan una mejor sensibilidad (hasta un 20 % de incremento en la positividad) y disminuyen el tiempo de crecimiento de las micobacterias de 10-14 días. En medios sólidos, puede durar hasta 8 semanas antes que haya un crecimiento mico-bacteriano (*M. bovis*). La WHO recomienda ambos medios, sólidos y líquidos para el cultivo primario de las micobacterias.

### Q-PCR

Todavía trabajamos con un equipo de PCR punto final. El equipo de Q-PCR que no solamente detecta la presencia de ADN en muestras sino que también cuantifique la cantidad de ADN presente en una muestra y registre los procesos de amplificación en el PCR. Es la “última” tecnología y debe ser incorporado en los PCRs de rutina en el laboratorio.

### Tuberculina PPD

En Europa y los EEUU la prueba de tuberculina PPD ya fue reemplazada por la prueba de interferón gamma. Es urgente que vayamos hacia ese mismo camino; reemplazar la prueba de tuberculina por la prueba de interferón gamma o la aplicación de ambas pruebas para tener un mejor diagnóstico de pacientes infectados con TB, así se puede evitar un sobre-tratamiento o sub-tratamiento de pacientes infectados por TB con todas las consecuencias que conlleva.

### Personal

La emigración laboral de profesionales en Venezuela ha tenido un impacto de importancia al funcionamiento del laboratorio. Desde el año 2014 aproximadamente 15 profesionales han emigrado; con formación en el laboratorio, son profesionales que después de su tesis de grado se quedaron trabajando en el mismo, y luego han salido para ejercer o avanzar en sus estudios en otros países. La Universidad Central de Venezuela contribuye al laboratorio con la contratación de un profesor de dedicación exclusiva, cuando el laboratorio aporta un promedio de 7 publicaciones anual en revistas indexadas en Scopus, es un aporte en desequilibrio con la producción científica. La producción científica es uno de los pilares que da un ranking a la Universidad y su prestigio internacional.

### PRODUCTIVIDAD DEL LABORATORIO

El laboratorio de tuberculosis, desde sus inicios, ha ejecutado diferentes proyectos de investigación de tipo operacional e investigación que debe aportar a mejorar el diagnóstico y el control de TB, micobacteriosis y otras infecciones respiratorias en Venezuela. Desde el año 2000 se han generado más de 100 publicaciones en revistas internacionales, de las cuales unas 35 han sido de alto impacto y citadas desde 20 hasta 250 veces en otras publicaciones.

Una de las primeras publicaciones de nuestro laboratorio se enfocó en la prevalencia de TB en niños del pueblo indígena Warao, la población indígena que habita en el Delta Amacuro. Se encontró una prevalencia de TB del 5%, una de las prevalencias más

alta a nivel mundial registrada en niños (Fernández de Larrea *et al.*, 2002). Con la colaboración de estudiantes de la escuela de Medicina José María Vargas, el pueblo indígena Warao ha permanecido a lo largo de los años como objeto de atención primaria y de investigación. Asistimos en el diagnóstico de TB, HIV, hepatitis B en esta población, siempre trabajando desde la atención primaria, atendiendo los problemas de salud de este pueblo. Conjuntamente con grupos de estudiantes, se ha determinado la situación sanitaria precaria que vive el pueblo indígena Warao, mostrando que más de 40% de los niños no llega a la edad de 5 años como consecuencia de infecciones respiratorias y por diarrea (Villalba *et al.*, 2013).

También en este pueblo indígena, fue estudiada la primera aplicación de la vacuna contra neumococos PCV 13, en Venezuela y su efecto sobre la prevalencia de ciertos serotipos de *S. pneumoniae* mostrando que la vacuna puede proteger a los niños del pueblo indígena Warao contra la neumonía causada por neumococos (Rivera-Olivero *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2016; Vergahen *et al.*, 2017). Concerniente a Hepatitis y HIV en el pueblo indígena Warao se realizaron diversas investigaciones que captaron la atención internacional (Rangel *et al.*, 2015; Villalba *et al.*, 2013; Rangel *et al.*, 2012). Por ejemplo se encontró una frecuencia extremadamente alta de cepas VIH tipo CXCR4 circulando entre los Warao en comparación con las cepas de VIH-1 que infectan a la población criolla, la cual hace que el pueblo indígena Warao sea más sensible a la infección y al progreso a SIDA.

Concerniente a TB y la epidemiología (molecular) junto con un grupo de investigadores internacionales se han descritos genotipos de *M. tuberculosis* que se han distribuido en el pueblo indígena Warao, en la población criolla y en el mundo, lo que demuestra su gran capacidad de adaptación a las diversas poblaciones (Filliol *et al.*, 2003; Diaz Acosta *et al.*, 2019; Abadia *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2008). El objetivo de estas investigaciones fue encontrar cepas más virulentas, o factores de virulencia, determinar la presencia de brotes y evaluar la calidad de programas de control de TB. Se determinaron que la mayoría de

los venezolanos están infectados con LAM y LAM RioDR, cepas probablemente introducidas desde España y Portugal y que se han "adaptado" a la población criolla.

Sobre el diagnóstico de TB, un estudio de importancia, fue la evaluación de un método de cultivo denominado el método de Kudoh. Esta metodología ahora nos permite procesar más de 30 muestras clínicas por día, algo casi imposible con las técnicas tradicionales (Jaspe *et al.*, 2009). También la introducción de la determinación de ADA en muestras clínicas como líquido pleural, ascítico, pericárdico y cefalorraquídeo nos ha ayudado a mejorar enormemente el diagnóstico de formas de TB extra pulmonares. Una publicación sobre el impacto de esta prueba en el diagnóstico de TB en Venezuela está en proceso y será publicada al finalizar el año. Gracias a la gran experiencia que el laboratorio tiene en el diagnóstico de TB nos han invitado a escribir diversas revisiones y capítulos de libros sobre el diagnóstico (de Waard *et al.*, 2007; Terán *et al.*, 2015).

El trabajo conjunto con dermatología ha rendido muchos frutos. En el año 2004 "descubrimos" que infecciones en tejido blando posterior a intervenciones quirúrgicas fueron causadas por micobacterias no tuberculosas, popularmente llamadas micobacterias atípicas. Este "descubrimiento" abrió una nueva línea de investigación en lo cual ayudamos, en establecer un diagnóstico correcto para los médicos Dermatólogos, y así poder iniciar un tratamiento adecuado. Hemos estudiado los brotes causados por estas infecciones por el uso de productos contaminados y mala desinfección y esterilización en varios procedimientos como: cosméticos, cirugía plástica o acupuntura (Rivera-Olivero *et al.*, 2006; Piquero *et al.*, 2004; Torres-Coy *et al.*, 2016; Torres-Coy *et al.*, 2017; Guevara-Patiño *et al.*, 2010). Describimos una nueva especie de micobacteria, aislada de un paciente de Dermatología que ahora lleva el nombre *M. cosmeticum* (Cooksey *et al.*, 2004). También estudiamos procesos de desinfección y esterilización, mostrando la deficiencia en Venezuela sobre la clasificación de desinfectantes, y las que causan la

mayoría de las infecciones con micobacterias. Las micobacterias son sumamente resistentes a procesos de desinfección, requiriendo desinfectantes de alto nivel (Bello *et al.*, 2006; Bello *et al.*, 2008). Un estudio, además sugiere que un producto casero como vinagre resultó ser un mejor desinfectante que muchos productos comerciales que se presentan en el mercado venezolano como un desinfectante de alto nivel (Cortesía *et al.*, 2014).

## FUTURAS INVESTIGACIONES

En los próximos años nuestra investigación se dedicara sobre todo al mejoramiento del diagnóstico de TB. Estamos en este momento evaluando una nariz electrónica, que huele la TB. En conjunto con un grupo en los EEUU, usamos la detección de LAM, un componente que forma parte de la pared de *M. tuberculosis* para el diagnóstico de TB. Una simple muestra de orina puede ser la muestra de elección en un futuro para diagnosticar la TB (Scientific reports, publicación aceptada). Con otros grupos de investigación internacional estamos desarrollando algoritmos clínicos e inmunológicos para mejorar el diagnóstico de TB infantil, una prioridad de investigación según la OPS.

Ya hemos determinado que la biología molecular, específicamente la transcripción de ciertos genes, puede ayudar en el diagnóstico de TB en niños (Verhagen *et al.*, 2013) y queremos profundizar esta investigación en un futuro cercano. Recientemente mostramos que el agua de los servicios odontológicos en Venezuela está contaminada con micobacterias atípicas causando infección en pacientes odontológicos (Perez-Alfonzo *et al.*, 2020; Castellano *et al.*, 2020). Estamos desarrollando y evaluando nuevos desinfectantes que puede atacar la biopelícula en estos sistemas de agua para hacer que ésta en las sillas odontológicas sea segura en los tratamientos de los pacientes. Por supuesto el desarrollo de trabajos de investigación en el futuro se realizará conjuntamente con los estudiantes de pregrado y posgrados aumentando la capacidad investigativa del laboratorio pero también para divulgar nuestro conocimiento y preparar un nuevo relevo de investigadores.

## CONCLUSIONES

El Laboratorio de Tuberculosis ha mostrado en sus 20 años de trabajo que se puede combinar la atención al público y el diagnóstico de tuberculosis con la investigación. Estar en la investigación nos ha permitido actualizarnos constantemente lo cual ha aportado un mejoramiento en el diagnóstico y en la atención al público. Además, la elaboración de numerosas publicaciones, que involucran estudiantes de pre y postgrado, han permitido ir aumentando el prestigio de nuestro laboratorio pero también la formación de nuevos profesionales.

## REFERENCIAS

- ABADIA E., SEQUERA M., ORTEGA D., MENDEZ MV., ESCARLONA A., DA MATA O., IZARRA E., ROJAS Y., JASPE R., MOTIWALA A., ALLAND D., DE WAARD JH., TAKIFF H. (2009). "Mycobacterium tuberculosis ecology in Venezuela: Epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24". *BMC Infectious Diseases* 9:122.
- BELLO T., RIVERO-OLIVERA I., DE WAARD JH., (2006). "Inactivation of mycobacteria by disinfectants with a tuberculocidal label". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24(5):319-321.
- BELLO-GONZALEZ T., ROSALES-PANTOJA R., ACOSTA-GIO E., DE WAARD J.H. (2008). "Instrument processing with lauryl dimethyl benzyl ammonium bromide: A challenge for patient safety". *American Journal of Infection Control* 36(8):598-601.
- CASTELLANO-REALPE O.J., GUTIÉRREZ J.C., SIERRA D.A., PAZMIÑO MARTÍNEZ L., PRADO PALACIOS Y., ECHEVERRÍA G., DE WAARD JH. (2020). "Dental unit waterlines in Quito and Caracas contaminated with non tuberculous mycobacteria: A potential health risk in dental practice". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(7):2348.
- COOKSEY R.C., DE WAARD J.H., YAKRUS M.A., RIVERA I., CHOPITE M., TONEY SR., MORLOCK GP., BUTLER W.R. (2004). "Mycobacterium cosmeticum sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(6):2385-2391.
- CORTESIA C., VILCHEZE C., BERNUT A., CONTRERAS W., GOMEZ K., DE WAARD J.H., JACOBS W., KREMER L.,

- TAKIFF H., (2014). "Acetic Acid, the Active Component of Vinegar, Is an Effective Tuberculocidal Disinfectant". *mBio* 5:00013-14.
- DE WAARD J.H., ROBLEDO J. (2007). "Conventional diagnostic methods". *Tuberculosis 2007 for basic science to patient care*. pp 401-420.
- DÍAZ-ACOSTA C.C., RUSSOMANDO G., CANDIA N., RITACCO V., VASCONCELLOS S.E.G., DE BERRÊDO PINHO-MOREIRA M., DE ROMERO N.J., MORCILLO N., DE WAARD J.H., GOMES H.M., SUFFYS P.N. (2019) "Exploring the "Latin American Mediterranean" family and the RDRio lineage in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Paraguay, Argentina and Venezuela". *BMC Microbiology* 19:131.
- FERNÁNDEZ DE LARREA C., FANDIÑO C., LÓPEZ D., DEL NOGAL B., RODRÍGUEZ N., CONVIT J., ARAUJO Z., DE WAARD J. (2002). "Tuberculosis en menores de 15 años en la población Warao de Venezuela". *Investigación Clínica* 43:35-48.
- FILLIOL I., DRISCOLL J.R., VAN SOOLINGEN D., KREISWIRTH B.N., KREMER K., VALÉTIUDIE G., DANG D.A., BARLOW R., BANERJEE D., BIFANI P.J., BRUDEY K., CATALDI A., COOKSEY R.C., COUSINS D.V., DALE J.W., DELLAGOSTIN O.A., DROBNIOWSKI F., ENGELMANN G., FERDINAND S., GASCOYNE-BINZI D., GORDON M., GUTIERREZ M.C., HAAS W.H., HEERSMA H., KASSA-KELEMBHO E., HO M.L., MAKRIATHIS A., MAMMINA C., MARTIN G., MOSTRÖM P., MOKROUSOV I., NARBONNE V., NARVSKAYA O., NASTASI A., NIOBE-EYANGO S.N., PAPE J.W., RASOLOFO-RAZANAMPARANY V., RIDELL M., ROSSETTI M.L., STAUFFER F., SUFFYS PN., TAKIFF H., TEXIER-MAUGEIN J., VINCENT V., DE WAARD J.H., SOLA C., RASTOGI N. (2003). "Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study". *Journal of Clinical Microbiology* 41(5):1963-1970.
- GUEVARA-PATIÑO A., SANDOVAL DE MORA M., FARRERAS A., RIVERA-OLIVERO I., FERMIN D., DE WAARD J.H. (2010). "Soft tissue infection due to *Mycobacterium fortuitum* following acupuncture: A case report and review of the literature". *Journal of Infection in Developing Countries* 4(8):521-525.
- JASPE R.C., ROJAS Y.M., FLORES L.A., SOFIA TORO E., TAKIFF H., DE WAARD J.H. (2009). "Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas". *Tropical medicine & international health* 14(4):468-471
- MAES M., KREMER K., VAN SOOLINGEN D., TAKIFF H., DE WAARD J.H. (2008). "24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela". *Tuberculosis* 88(5):490-494.
- PÉREZ-ALFONZO R., POLEO-BRITO L.E., VERGARA M.S., RUIZ-DAMASCO A., MENESES-RODRÍGUEZ P.L., KANNEE-QUINTERO C.E., CARRERA-MARTINEZ C., RIVERA-OLIVER I.A., DA MATA O.J., RODRÍGUEZ-CASTILLO B.A., DE WAARD J.H. (2020). "Odontogenic cutaneous sinus tracts due to infection with nontuberculous mycobacteria: A report of three cases". *BMC Infectious Diseases*. 20(1):295.
- PIQUERO J., CASALS V.P., HIGUERA E.L., YAKRUS M., SIKES D., DE WAARD J.H. (2004). "Iatrogenic *Mycobacterium simiae* Skin Infection in an Immunocompetent Patient". *Emerging Infectious Diseases* 10(5):969-970.
- RANGEL HR., BELLO G., VILLALBA J.A., SULBARAN Y.F., GARZARO D., MAES M., LOUREIRO C.L., DE WAARD J.H., PUJOL F.H. (2015). "The Evolving HIV-1 Epidemic in Warao Amerindians Is Dominated by an Extremely High Frequency of CXCR4-Utilizing Strains". *AIDS Research and Human Retroviruses* 31(12):1265-1268.
- RANGEL H.R., MAES M., VILLALBA J., SULBARÁN Y., DE WAARD J.H., BELLO G., PUJOL F.H. (2012). "Evidence of at least two introductions of HIV-1 in the Amerindian Warao population from Venezuela". *PLoS ONE* 7(7):e40626.
- RIVERA-OLIVERO I.A., BOGAERT D., BELLO T., DEL NOGAL B., SLUIJTER M., HERMANS PW., DE WAARD J.H. (2007). "Pneumococcal carriage among indigenous Warao children in Venezuela: Serotypes, susceptibility patterns, and molecular epidemiology". *Clinical Infectious Diseases* 45(11):1427-1434.
- RIVERA-OLIVERO I.A., GUEVARA A., ESCALONA A., OLIVER M., PÉREZ-ALFONZO R., PIQUERO J., ZERPA O., DE WAARD J.H. (2006). "Soft tissue infections due to nontuberculous mycobacteria following mesotherapy. What is the price of beauty?". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24(5):302-306.
- TERAN R., DE WAARD J.H. (2015). "Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico". *The Journal of International Federation of Clinical Chemistry of Laboratory Medicine* 26(4):310-325.
- TORRES-COY J.A., RODRÍGUEZ-CASTILLO B.A., PÉREZ-ALFONZO R., DE WAARD J.H. (2016). "Source

investigation of two outbreaks of skin and soft tissue infection by *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in Venezuela". *Epidemiology and Infection* 144(5):1117-1120.

TORRES-COY J.A., CARRERA C., RODRÍGUEZ-CASTILLO B.A., RAMÍREZ-MURGA R., ORTIZ-CÁCERES W., PÉREZ-ALFONZO R., DE WAARD J.H. (2017). "Mycobacterium szulgai: an unusual cause of skin and soft tissue infection after breast augmentation". *International Journal of Dermatology* 56(6):e122-e124.

VERHAGEN L.M., RIVERA-OLIVERO I.A., HERMSEN M., SISCO M.C., MAES M., DEL NOGAL B., BOGAERT D., BERBERS G.A., HERMANS P.W., DE JONGE M.I., DE WAARD J.H. (2016). "Introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in an isolated pneumococcal vaccine-naïve indigenous population". *European Respiratory Journal* 48(5):1492-1496.

VERHAGEN L.M., HERMSEN M., RIVERA-OLIVERO I.A., SISCO M.C., DE JONGE M.I., HERMANS P.W., DE WAARD J.H. (2017). "Nasopharyngeal carriage of respiratory pathogens in Warao Amerindians: significant relationship with stunting". *Tropical Medicine and International Health* 22(4):407-414.

WHO. (2019). "Global tuberculosis report 2019". Geneva: World Health Organization, 2019. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Consulta Junio 2020.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los estudiantes que pasaron por el laboratorio. Sin ellos no hubiese sido posible llegar hasta donde estamos ahora. La mayoría de los nombres de estos estudiantes se pueden encontrar en las publicaciones del laboratorio ya que gran parte de ellos, que hicieron su tesis de pregrado o postgrado, terminaron publicando sus resultados. También gracias a los pacientes (Criollo y Warao) que participaron en las investigaciones, las cuales siempre tenían el objetivo de mejorar la atención primaria.

Por supuesto las colaboraciones internacionales con países en Europa y en Latinoamérica han sido importante para el desarrollo del laboratorio y nos han permitido entrenar personal en técnicas especiales e intercambiar datos y resultados lo cual ha permitido publicar estudios multicéntricos de alto nivel. Es

importante aquí subrayar la colaboración con la Dra. Flor Pujol (HIV y Hepatitis) y el Dr. Howard Takiff (TB y desinfectantes) del IVIC, la Dra. Berenice del Nogal, pediatra del Hospital de Niños y profesora de la UCV con el trabajo con niños y la tutoría de los estudiantes de Medicina de la Escuela José María Vargas. Sin estas colaboraciones muchos estudios no pudieran haberse realizado. Especial reconocimiento también para la Dra. Zaida Araujo de nuestra institución quien participó en estas investigaciones y generó sus propios estudios inmunológicos que están en otro capítulo en esta revista.

# Melasma en mujeres latinas y caucásicas de Venezuela

**Zulay Rivera**<sup>1,2</sup>

drazulayderma@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1278-6691>

**Ingrid Rivera**<sup>1,2</sup>

draingridderma@gmail.com

**Víctor Ollarves**<sup>2</sup>

drvictorlaser@gmail.com

**Dennis A. Lugo**<sup>1,2</sup>

deallugo@gmail.com

**Isabel Hagel**<sup>1,2</sup>

isabelhagel@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Unidad Médico Estética Laser UNIMEL, Caracas, Venezuela.

## RESUMEN

Se evaluó la presencia de melasma en un grupo (870) de mujeres (25-45 años) de nivel socioeconómico medio-alto. Se examinó la piel del rostro las pacientes mediante registro fotográfico digital utilizando el sistema VISIA y se determinó el fototipo (I-VI). Las mujeres con piel de origen caucásico (de padre y madre europeos) correspondieron a los fototipos II y III mientras que las latinas (hispanas con mezcla indígena y/o afro-descendencia) a los fototipos IV y V. Se evaluó la presencia de melasma (manchas marrones), vascularización de las lesiones (áreas rojas) y signos de fotoenvejecimiento (arrugas, elasticidad de la piel y distensión del poro facial) mediante VISIA, evaluación clínica, ecografía y perfil hormonal tiroideo. La frecuencia de melasma fue mayor entre mujeres de ascendencia latina ( $p < 0,0001$ ). Arrugas, pérdida de la elasticidad y distensión del poro facial fueron más frecuentes ( $p < 0,0001$ ) en mujeres caucásicas. La pérdida de elasticidad de la piel se asoció al desarrollo de melasma en mujeres caucásicas ( $p = 0,0002$ ) pero no en latinas. La frecuencia de embarazos, trastornos tiroideos y consumo de anticonceptivos se asoció al melasma en ambos grupos ( $p < 0,005$ ). Se encontró una asociación entre antecedentes de alergia y melasma solo en mujeres caucásicas ( $p = 0,002$ ). La vascularización de las lesiones fue más significativa en mujeres latinas ( $p < 0,05$ ). El uso de protector solar y la práctica de ejercicio físico fueron factores protectores. Así, la frecuencia de melasma es mayor en mujeres latinas, difiriendo las características y factores de riesgo de los de las de origen caucásico lo cual es importante para definir protocolos de tratamiento.

**Palabras Clave:** Mujeres caucásicas; Melasma; Elasticidad de la piel; Desórdenes tiroideos; Contraceptivos

## MELASMA IN LATIN AND CAUCASIAN WOMEN OF VENEZUELA

### ABSTRACT

The presence of melasma was evaluated in 870 women (25-45 years) from medium-high socioeconomic level. Patients' facial skin was examined by digital photographic recording using the VISIA system and photo type (I-VI) was

determined. Women with Caucasian skin (of European father and mother) corresponded to photo types II and III, while Latinas (Hispanics with indigenous and / or Afro-descendant mix) to photo types IV and V. Melasma (brown spots), lesion vascularization (red areas) and signs of photo aging (wrinkles, skin elasticity and facial pore distension) (VISIA), clinical signs, ultrasound and thyroid hormone profile were evaluated. Melasma was higher among women of Latino descent ( $p < 0.0001$ ). Wrinkles, loss of elasticity and facial pore distention were more frequent ( $p < 0.0001$ ) in Caucasian women. Loss of skin elasticity was associated with the development of melasma in Caucasian women ( $p = 0.0002$ ) but not in Latinas. The frequency of pregnancy, thyroid disorders, and contraceptive use was associated with melasma in both groups ( $p < 0.005$ ). An association between allergy antecedents and melasma was found only in Caucasian women ( $p = 0.002$ ). Vascularization of the lesions were more significant in Latin women ( $p < 0.05$ ). The use of sunscreen and physical were protective factors. Thus, the frequency of melasma is higher in Latino women, differing the characteristics and risk factors of those of Caucasian origin, which is important to define treatment protocols.

**Keywords:** Caucasian women; Melasma; skin elasticity; Thyroid disorders; Contraceptives.

## INTRODUCCIÓN

El color normal de la piel viene determinado por la actividad de los melanocitos los cuales se localizan en la capa basal de la epidermis y en la parte inferior de los folículos pilosos. Estas células sintetizan melanina, un pigmento cuya función principal es la absorción de la radiación ultravioleta. También se encuentran melanocitos en el oído interno, el iris y coroides así como en el sistema nervioso central y en el corazón humano (Handel *et al.*, 2014; Vashi y Kundu, 2013). La síntesis de melanina, se efectúa en los melanosomas, organelos intracitoplasmáticos de la familia de los lisosomas (Montaudié *et al.*, 2014; Vashi y Kundu, 2013). Este proceso comprende una serie sucesiva de reacciones, catalizadas por diferentes enzimas que transforman la tirosina en melanina. La melanina producida puede ser de dos tipos, la eumelanina y la feomelanina que se distribuyen en proporciones diferentes en el ser humano. La eumelanina es una melanina de color marrón o negro y de peso molecular elevado, insoluble en la mayoría de disolventes. La feomelanina se caracteriza por un color amarillo anaranjado y es soluble en las bases (Cichorek *et al.*, 2013). Estos dos pigmentos se derivan de un precursor

común, la dopaquinona, que deriva de la oxidación de la tirosina por la enzima tirosinasa. La vía de síntesis de la eumelanina y de la feomelanina es diferente. La síntesis de la eumelanina (eumelanogénesis) requiere además de la tirosinasa de la presencia de otras tres enzimas, la proteína relacionada a la tirosinasa- 1 (TYRP1), la proteína relacionada a la tirosinasa- 2 (TYRP2) y la dopacromotautómera (DCT), mientras que la vía de síntesis de la feomelanina (feomelanogénesis) requiere la incorporación de derivados azufrados (Cichorek *et al.*, 2013; Handel *et al.*, 2014; Montaudié *et al.*, 2014). La relación eumelanina/feomelanina está determinada por la actividad de las enzimas de la melanogénesis y la disponibilidad de tirosina o de compuestos azufrados. La melanogénesis se lleva a cabo tras la activación del gen MITF (factor de transcripción asociado a la microftalmia), responsable de la síntesis de tirosinasa, de TRP1 y de TRP2. El MITF es esencial para el desarrollo embrionario y la viabilidad postnatal de los melanocitos (Cichorek *et al.*, 2013). El color natural de la persona puede variar en un individuo bajo la influencia de los rayos UV que favorece la eumelanogénesis.

En respuesta a la radiación UV los melanosomas son transportados desde los melanocitos a los queratinocitos en donde se van a ubicar encima del núcleo a fin de proteger su material genético de los efectos nocivos de la radiación UV. Bajo la acción de los rayos UV aumenta la síntesis de eumelanina y se acelera su paso hacia los queratinocitos (Handel *et al.*, 2014; Montaudié *et al.*, 2014). Este proceso es una respuesta adaptativa del organismo a la exposición prolongada al sol. La melanina tiene una función fotoprotectora importante. Absorbe más del 90% de los rayos UV que han atravesado la capa córnea. Sin embargo, alrededor del 15% de los rayos UVB llega hasta la capa basal de la epidermis y el 50% de los rayos UVA alcanza la dermis. Los rayos UVB inducen la formación de dímeros en las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN), lo cual da lugar a defectos metabólicos que conducen al envejecimiento cutáneo, muerte celular o mecanismos de replicación alterados dando lugar al cáncer. Los rayos UVA, durante mucho tiempo fueron considerados como

inofensivos pero también tienen efectos perjudiciales, debido a la producción de radicales libres y de dímeros de pirimidinas (Costin y Hearing, 2007). La eumelanina tiene un poder fotoprotector superior al de la feomelanina. Es capaz de absorber los fotones emitidos y de captar los radicales libres generados en las células por las radiaciones UV, impidiendo el daño al ADN y protegiendo así la piel de los efectos nocivos de las radiaciones UV (Handel *et al.*, 2014).

Dentro de los desórdenes que conducen a la hipermelanosis, el melasma es el más frecuente y se produce por un trastorno funcional a nivel de la melanogénesis. Se caracteriza por la presencia de manchas irregulares medianamente simétricas, afectando principalmente zonas expuestas a la luz solar como la frente, mejillas y el área bajo la nariz (Passeron y Picardo, 2018). El melasma es clasificado histopatológicamente como epidérmico, dérmico y mixto, según la ubicación de la melanina. Frecuentemente en el 70% de los casos se observa sobrecarga pigmentaria en los melanocitos, queratinocitos y capa espinosa (melasma epidérmico), en 10-15% acúmulos melánicos en la dermis, algunos fagocitados por macrófagos (melasma dérmico) y en el 20% hay pigmento tanto en epidermis como en dermis (melasma mixto) (Passeron y Picardo, 2018). Por la distribución anatómica de las lesiones, hay tres patrones clínicos de melasma: a) centofacial, que ocurre en 64% de los casos e involucra mejillas, frente, labio superior, nariz y mandíbula; b) malar, que ocurre en 27% de los casos y está limitado a mejillas y nariz, y c) patrón mandibular, que está presente en 9% de los casos e involucra las ramas de la mandíbula. Estas características suelen comprobarse mediante lámpara de Wood o por estudio histopatológico (Suggs *et al.*, 2018). Estudios histopatológicos han revelado que la piel afectada presenta mayor número de melanocitos y mayor actividad de las enzimas melanogénicas a diferencia de la piel no afectada de la misma paciente (Smit *et al.*, 1998). En esta zona además existe un aumento de la vascularización así como elastosis solar y cambios en la membrana basal atribuibles a daño actínico (Kwon *et al.*, 2018; Park y Kang, 2018).

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la

presencia de melasma se encuentran el sexo femenino, el estar entre la tercera y cuarta década de la vida (Park y Kang, 2018), el embarazo (con una prevalencia de aproximadamente 15% entre mujeres gestantes) (Goglia *et al.*, 2014), el uso de hormonas femeninas estrogénicas, progestagénicas o mixtas (Cestari *et al.*, 2009). La radiación solar constituye un factor desencadenante y agravante (Cestari *et al.*, 2017) de hecho, la mayoría de los casos se inician en verano, o empeoran tras exponerse al sol siendo el uso de bloqueadores solares un factor clave en su tratamiento. Otros factores encontrados son el componente genético el uso de algunos cosméticos derivados del petróleo, ciertas drogas como la fenitoína, y el estrés emocional (Handel *et al.*, 2014; Park y Kang, 2018). Se ha reportado también relaciones entre el melasma con enfermedades tiroideas (Rivera *et al.*, 2015; Rostami Mogaddam *et al.*, 2015). Ha sido reportado que el melasma es una enfermedad propia de regiones con mayor exposición solar como América del Sur y Asia en las que predominan fototipos oscuros y que a la vez poseen bajo nivel socioeconómico. Sin embargo existe escasa información sobre la prevalencia o la incidencia de esta condición en dichas regiones (Cestari *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2015).

Venezuela, como otros países latinoamericanos, es un país multi étnico en donde conviven diferentes grupos étnicos desde blancos de ascendencia caucásica, afrodescendientes, indígenas con o sin mestizaje y en gran parte latinos. Los latinos constituyen un grupo étnico que abarca principalmente Centroamérica, Sudamérica y parte de las islas caribeñas. Este grupo étnico está compuesto por el mestizaje de diversas poblaciones que incluyen indígenas, nativos, descendientes africanos y europeos, principalmente españoles (Ferrándiz, 2011). Como resultado de esta combinación se distinguen distintos tonos de piel en países latinoamericanos incluyendo desde el fototipo II al fototipo VI (Narea *et al.*, 2015). La piel de los latinos corresponde principalmente a los fototipos IV y V (Dávila, 2018) Desde el punto de vista dermatológico esta situación representa un reto, necesitando directrices particulares de diagnóstico y tratamiento, así como de

las alteraciones que se producen en pacientes con distintos tipos de piel. Si bien se ha reportado que la piel latina es menos susceptible a las arrugas y más propensa a las manchas durante el proceso de fotoenvejecimiento (Cestari *et al.*, 2017), no existen trabajos previos en donde se haya descrito cuantitativamente las diferencias en cuanto a la presencia de melasma de la piel en mujeres latinas comparadas con aquellas de origen caucásico, viviendo en condiciones socio ambientales similares. Tampoco sobre las posibles diferencias en los factores de riesgo que promueven la aparición del melasma entre estos grupos. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue comparar los factores de riesgo para melasma entre mujeres Venezolanas de origen latino y aquellas de ascendencia caucásica del mismo grupo etario y nivel socioeconómico similar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo el estudio en un grupo no seleccionado de 870 pacientes de sexo femenino entre 25 y 45 años de edad, que acudió a la consulta de la Unidad Médico Estética Láser (UNIMEL) en Caracas, Venezuela, desde Septiembre de 2012 a Septiembre de 2016. Se obtuvo consentimiento informado siguiendo los lineamientos del Protocolo de Helsinki (Manzini, 2009) para el registro fotográfico y publicación de los datos. Se consideraron criterios de exclusión la supresión inmunológica, antecedentes personales de fotosensibilidad, diagnóstico de enfermedad vascular del colágeno y un período de tiempo  $\leq 6$  meses después del uso de productos para aclarar la piel.

### Evaluación de la piel de las pacientes

Se evaluó la piel del rostro de las pacientes mediante registro fotográfico digital utilizando el sistema VISIA (VISIA Complexion Analysis (Canfield Scientific, Fairfield, NJ, EE.UU) y se determinó el fototipo (I- VI). Para el propósito de este trabajo se evaluó la presencia de melasma (manchas marrones definidas de extensión variable) y áreas rojas que corresponden a trastornos vasculares en la lesión en las pacientes. Se utilizó el VISIA para evaluar también otros signos de foto envejecimiento como tersura de la piel, presencia

de arrugas y tamaño del poro. Además de la información proporcionada por el registro fotográfico, el sistema VISIA compara automáticamente el área, oscuridad y heterogeneidad de las manchas de un determinado paciente con una escala de percentiles, construida a partir de parámetros ideales con piel sana de una población de individuos del mismo sexo, edad y tipo de piel. El percentil 100 corresponde a una piel sin manchas y/o tersa, sin poros distendidos y sin arrugas. El percentil 1 corresponde a una piel con diferencias marcadas en la homogeneidad del color de la piel y/o la presencia de manchas marrones oscuras que difieren en extensión características del melasma, así como de áreas rojas correspondientes a trastornos vasculares de la piel o al de una piel arrugada con mucha pérdida de elasticidad y/o poros dilatados. Para la evaluación, se limpió la piel de las pacientes con un removedor de maquillaje facial suave antes de obtener la imagen. Las imágenes fotográficas se capturaron con luz estándar, polarizada cruzada, polarizada en paralelo y ultravioleta. Las imágenes se tomaron en dos vistas de primer plano diferentes (lateral derecho 37°, lateral izquierdo 37°) para cada paciente.

### Determinación de los factores de riesgo para el melasma

La evaluación clínica incluyó un cuestionario de hábitos personales (consumo de cigarrillos, ingesta de alcohol, exposición al sol, ejercicio físico, uso de protector solar), antecedentes clínicos incluyendo uso de anticonceptivos, número de embarazos, antecedentes de diabetes, hipertensión, cirugías previas antecedentes personales y familiares de alergia y antecedentes familiares de melasma. Los trastornos hormonales fueron evaluados mediante ecografía y perfil hormonal tiroideo.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa comercial GraphPad Prism versión 5 (San Diego, California USA). Las proporciones de pacientes con o sin melasma entre mujeres caucásicas y latinas se compararon utilizando la prueba de Fisher con dos colas, calculándose el riesgo relativo con un Intervalo de Confianza de 95%. Para conocer la influencia de

distintos parámetros socio-ambientales y clínicos sobre la presencia de melasma se realizó un análisis correlativo no paramétrico utilizando la prueba de Spearman con un Intervalo de Confianza de 95%.

## RESULTADOS

Se consideraron latinas aquellas pacientes de ascendencia española con mestizaje indígena y/o africana. De ascendencia caucásica aquellas pacientes europeas o hijas de padre y madre europeos, los cuales representan una proporción significativa de los habitantes de la ciudad de Caracas (Tarver Denova y Frederick, 2005). Del total de pacientes evaluadas, 478 respondieron al perfil de latinas y 392 al de caucásicas. Las mujeres de origen caucásico correspondieron a los fototipos II y III mientras que las latinas (hispanas con mezcla indígena y/o afrodescendencia) a los fototipos IV y V. No hubo pacientes que correspondieran a las características de los fototipos I o VI, según datos proporcionados por el sistema VISIA.

El examen de la piel según VISIA reveló que la frecuencia de pacientes con lesiones características de melasma (manchas marrones) en el grupo de pacientes evaluadas fue significativamente mayor ( $p > 0,0001$ ) entre mujeres de ascendencia latina, con fototipos IV y V, comparada con la observada en las de ascendencia caucásica con fototipos II y III, considerándose así la “piel latina” como un factor de riesgo importante en el desarrollo de melasma entre mujeres Venezolanas (figura 1).

Se evaluaron también signos de foto envejecimiento tales como pérdida de la elasticidad, aumento en el tamaño del poro y presencia de arrugas faciales. En la figura 2 se observa que el grupo de mujeres latinas se ubicó en percentiles más elevados en la escala del VISIA en estos parámetros (H de Kruskal Wallis: 218;  $p < 0,0001$ ). La aplicación posterior de la prueba múltiple de Dunn reveló diferencias significativas en las medianas de los valores de los percentiles reportados por el VISIA para la presencia de arrugas faciales ( $p < 0,0001$ ); elasticidad de la piel ( $p < 0,0005$ ) y distensión del poro facial ( $P < 0,0005$ ) entre mujeres latinas y caucásicas (figura 2).

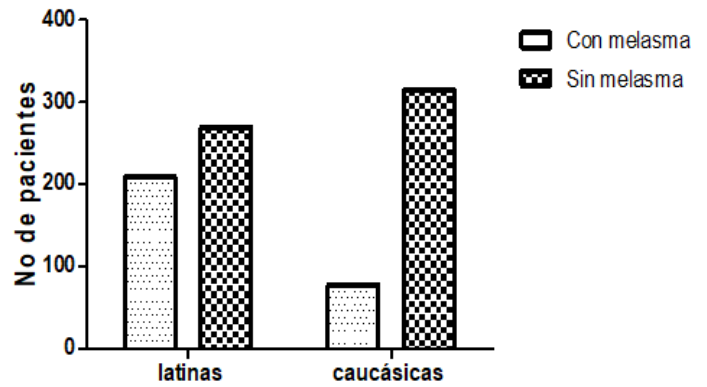


Figura 1. Prevalencia de melasma en un grupo de pacientes venezolanas según procedencia étnica.

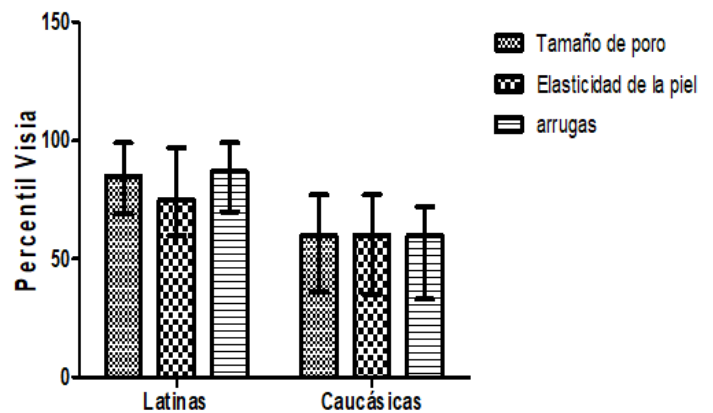


Figura 2. Mediana de los valores en el foto envejecimiento en mujeres venezolanas latinas y caucásicas.

En la tabla I se observa la influencia de distintos factores en la presencia de melasma en el grupo de mujeres latinas y el de caucásicas. Las comparaciones se realizaron utilizando la prueba de correlación de Spearman entre la ubicación en la escala de percentiles del VISIA de cada paciente para manchas marrones (características de la presencia de melasma) con la presencia o ausencia del factor socio ambiental. Los resultados muestran que en las mujeres caucásicas el hábito de fumar ( $p = 0,041$ ) y los trastornos de sueño ( $p = 0,038$ ) influyeron significativamente en la presencia de melasma. En cambio, en las mujeres latinas ninguno de estos factores tuvo influencia sobre la presencia de melasma (tabla I).

En la tabla II se comparan algunos hallazgos clínicos que previamente se han asociado a la presencia de melasma en mujeres Venezolanas (Rivera *et al.*, 2015). Para examinar la relación entre pérdida de la elasticidad

**Tabla I.** Factores socioambientales que influyen en la aparición del melasma en mujeres venezolanas.

	<b>Caucásicas</b>	<b>Latinas</b>
<b>N</b>	104	228
<b>Hábito de Fumar</b>		
Spearman r	0,372	0,187
Valor p (2 colas)	0,041	0,232
Significancia	*	Ns
<b>Ingesta de licor</b>		
Spearman r	0,042	0,104
Valor p (2 colas)	0,847	0,628
Significancia	Ns	Ns
<b>Ingesta de café</b>		
Spearman r	0,324	0,374
Valor p (2 colas)	0,106	0,185
Significancia	Ns	Ns
<b>Trastornos del sueño</b>		
Spearman r	0,456	0,330
Valor p (2 colas)	0,038	0,106
Significancia	*	Ns

de la piel y melasma se compararon las ubicaciones en la escala de percentiles del VISIA de las pacientes para manchas marrones con la de tersura de la piel. Se observó que en las mujeres caucásicas el antecedente de alergia se asoció significativamente ( $p=0,028$ ) a la presencia de melasma mientras que los mismos no influyeron ( $p=0,128$ ) en la aparición de estas manchas en mujeres latinas. La presencia de trastornos tiroideos, el número de embarazos y el uso de anticonceptivos influyeron significativamente en la aparición del melasma independientemente de la ascendencia y tipo de piel de las pacientes (Tabla II).

En cuanto a los factores protectores, se encontró una asociación negativa significativa entre el uso de protector solar y la práctica de ejercicio físico en el gimnasio cubierto, con la aparición del melasma indicando el rol protector de estos factores en todas las pacientes independientemente del tipo de piel (Tabla III).

**Tabla II.** Hallazgos clínicos que influyen en la aparición de melasma en mujeres venezolanas.

	<b>Caucásicas</b>	<b>Latinas</b>
<b>N</b>	104	228
<b>Hipertensión</b>		
Spearman r	0,271	0,05
Valor p (2 colas)	0,458	0,946
<b>Diabetes</b>		
Spearman r	0,278	0,195
Valor p (2 colas)	0,224	0,387
<b>Antecedentes de asma, rinitis, dermatitis atópica</b>		
Spearman r	0,532	0,332
Valor p (2 colas)	0,028	0,128
<b>Antecedentes quirúrgicos</b>		
Spearman r	0,168	0,083
Valor p (2 colas)	0,454	0,711
<b>Trastornos tiroideos</b>		
Spearman r	0,562	0,521
Valor p (2 colas)	0,005	0,0024
<b>Nº de embarazos</b>		
Spearman r	0,534	0,523
Valor p (2 colas)	0,005	0,004
<b>Uso de anticonceptivos</b>		
Spearman r	0,572	0,561
Valor p (2 colas)	0,005	0,002
<b>Vascularización de la lesión (manchas rojas)</b>		
Spearman r	0,439	0,634
Valor p (2 colas)	0,032	0,0012
<b>Elasticidad de la piel</b>		
Spearman r	0,588	0,2211
Valor p (2 colas)	0,004	0,1243

## DISCUSIÓN

Las hiperpigmentaciones adquiridas son uno de los principales motivos de consulta dermatológica en América Latina (Cestari *et al.*, 2009). Su difícil tratamiento y el efecto negativo que tienen en la calidad de vida resaltan la importancia de su diagnóstico y efectividad del tratamiento. Los resultados de este trabajo indican que en un grupo de adultas jóvenes (25-45 años) Venezolanas, la aparición de melasma es más frecuente entre mujeres de ascendencia latina con fototipos IV y V que en las mujeres

**Tabla III.** Factores protectores frente al melasma según el tipo de piel en mujeres venezolanas.

	<b>Caucásica</b>	<b>Latina</b>
<b>N</b>	104	228
<b>Ejercicio físico</b>		
Spearman r	-0,892	0,776
Valor p (2 colas)	< 0,0001	0,0002
Significancia	***	***
<b>Uso de protector solar</b>		
Spearman r	-0,591	0,432
Valor p (2 colas)	0,005	0,003
Significancia	***	**
<b>Uso de emolientes</b>		
Spearman r	-0,112	0,338
Valor p (2 colas)	0,549	0,071
Significancia	Ns	Ns

de ascendencia caucásica con fototipos II y III, aunque pertenezcan al mismo grupo etario y vivan en condiciones socio-ambientales similares, confirmando estudios previos en otros países latinoamericanos (Cestari *et al.*, 2017; D'Elia *et al.*, 2017).

En este trabajo se encontró que las mujeres de ascendencia caucásica aunque menos susceptibles a la presencia de melasma, son más propensas a desarrollar otros signos tempranos de fotoenvejecimiento tales como arrugas faciales, distensión del poro facial y pérdida de la elasticidad de la piel. En ellas, la aparición de melasma se asoció a la pérdida de elasticidad de la piel del rostro. Estudios histopatológicos en pacientes con melasma han demostrado que la elastosis solar favorece la expresión de moléculas señaladoras involucradas en el proceso de la melanogénesis en los melanocitos así como la liberación de citocinas estimuladoras de la síntesis de melanina en los fibroblastos (Kang *et al.*, 2002). Además las alteraciones en la membrana basal que ocurren durante el proceso de fotoenvejecimiento, facilitan la migración de melanocitos activos hacia la dermis (Kang *et al.*, 2002). Trabajos previos en otros países han reportado también que la elastosis solar en mujeres jóvenes es más frecuente entre las de ascendencia caucásica (Osborne *et al.*,

2018; Vashi *et al.*, 2016). Así en el grupo de mujeres caucásicas el melasma se desarrolló posiblemente como parte del proceso de envejecimiento prematuro de la piel por exceso de exposición al sol. Se encontró además en este grupo de pacientes que los antecedentes de alergia influyeron también a la aparición de melasma. En este sentido, se ha descrito que el factor de crecimiento de los mastocitos promueve la melanogénesis en la epidermis (Lee, 2014; Passeron y Picardo, 2018). Además, la histamina liberada por los mastocitos se une a sus receptores en los melanocitos e induce la síntesis de melanina. Este mecanismo ha sido demostrado en la urticaria pigmentosa y en otros trastornos pigmentarios ocasionados por exposición a la luz solar (Lee, 2014). A su vez es conocido el hecho de que la actividad de los mastocitos en piel es mayor en personas alérgicas (Theoharides *et al.*, 2015) y se ha detectado un mayor número de mastocitos en lesiones de melasma (Hernández-Barrera *et al.*, 2008). Sin embargo, no ha sido estudiado si una mayor reactividad cutánea frente a la histamina en mujeres atópicas se relacione con la aparición del melasma, aunque como se mencionó, las mujeres caucásicas son más sensibles a desarrollar elastosis solar, condición que favorece la expresión del receptor para el factor de crecimiento en los mastocitos y su consecuente capacidad para liberar histamina (Passeron y Picardo, 2018). La aparición de melasma en este grupo se encontró también asociada a factores relacionados al stress tales como el hábito de fumar y trastornos de sueño. El stress por diferentes causas ha demostrado ser un factor desencadenante del melasma (Cestari *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2015) aunque no se han reportado trabajos que indiquen que las mujeres caucásicas sean más vulnerables al stress que las latinas.

A diferencia de lo observado en el grupo de mujeres de ascendencia caucásica, el grupo de latinas, con fototipos IV y V, mostraron una piel menos arrugada, con poca distensión del poro facial y con menos pérdida de elasticidad. Se ha reportado que la dermis de la piel de individuos de fototipos oscuros, es más gruesa y compacta que la de la piel blanca. Además, existen evidencias de que los tipos de piel más oscura tienen más capas de células cornificadas y un mayor

contenido de lípidos en comparación con el estrato córneo de la piel blanca. Presenta un mayor número fibroblastos, de mayor tamaño, más nucleados y haces de fibras de colágeno más pequeños (Fajuyigbe y Young, 2016; Vashi *et al.*, 2016). Todas estas características probablemente contribuyen a la menor incidencia de arrugas faciales y elastosis como respuesta al daño solar que se observa en mujeres con pieles más oscuras comparada con las mujeres caucásicas. Sin embargo como se señaló, las latinas son más susceptibles a desarrollar melasma. Las pieles oscuras, características en la mujer latina, presentan melanosomas más grandes y con una ubicación más dispersa, comparados con los de las pieles más claras en donde los melanosomas son más pequeños y se encuentran agregados (Fajuyigbe y Young, 2016). Ha sido ampliamente aceptado que el contenido de melanina y el patrón de dispersión melanosomal en las pieles de fototipos oscuros es una adaptación para conferir protección contra el envejecimiento acelerado inducido por la radiación ultravioleta (UV) en los trópicos. Sin embargo, aunque estas características proporcionan protección contra muchos efectos dañinos de los rayos UV (Vashi *et al.*, 2016), resultan en una mayor vulnerabilidad a los trastornos pigmentarios, como se evidenció en el grupo de mujeres latinas de este estudio. En este sentido el análisis transcripcional en lesiones de melasma en pacientes femeninas ha mostrado la sobre estimulación de varios genes y factores de transcripción asociados a la metalogénesis tales como TYR, MITF y TYRP1 (Kang *et al.*, 2011). Es necesario puntualizar que la pigmentación cutánea constitutiva es un rasgo poligénico. En los últimos años, ha sido identificado un número significativo de genes y las variantes alélicas que afectan diferencialmente la pigmentación de la piel humana en diferentes grupos étnicos, incluyendo TYR y TYRP1 (Del Bino *et al.*, 2018).

Se encontró una influencia marcada de la presencia de trastornos tiroideos, número de embarazos y uso de anticonceptivos en la aparición del melasma independientemente del tipo de piel, confirmando los resultados de trabajos previos realizados en pacientes con melasma en Venezuela (Rivera *et al.*, 2015) y en

otros países de Latinoamérica (Cestari *et al.*, 2017). La presencia de áreas rojas en las lesiones de melasma revela un incremento en el número de vasos sanguíneos en las lesiones pigmentadas de melasma en los dos grupos. Trabajos previos han señalado un aumento de hasta 68% de los vasos sanguíneos en la dermis de las lesiones de melasma (Arellano, 2017; Park y Kim, 2017). Sería necesario estudiar con mayor profundidad alteraciones en la vasculatura dérmica en pacientes con melasma tanto en latinas como en caucásicas de tal manera de tratar estas lesiones tomando en cuenta el componente vascular. Es importante que los resultados del trabajo señalan la importancia del uso de protectores solares y la práctica rutinaria del ejercicio para prevenir la aparición de lesiones de melasma independientemente del tipo de piel o ascendencia étnica de las pacientes.

Los resultados de este trabajo sugieren que la procedencia étnica es un factor importante en la etiología del melasma. Los cambios estructurales en la piel en respuesta a la exposición del sol fueron distintos en mujeres de origen latino comparados con los de las de ascendencia caucásica. Resultados similares se han obtenido en trabajos anteriores en donde comparando la piel de mujeres chinas y francesas caucásicas, que no diferían significativamente en la exposición solar a largo de su vida, se observó que aunque se retrasa la aparición de arrugas en las mujeres chinas, la pigmentación de las manchas es mucho más intensa y prevalente en las mismas comparado con las caucásicas (Nouveau-Richard *et al.*, 2005).

Surge así la necesidad de trabajos de corte epidemiológico más extensos para confirmar estos hallazgos y desarrollar protocolos de tratamientos adecuados a cada tipo de piel. También es necesario estudiar con mayor profundidad las diferencias en los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de melasma en pacientes que difieren en el tipo de piel dependiendo de su ascendencia étnica.

## REFERENCIAS

CESTARI T, ARELLANO I, HEXSEL D, ORTONNE J. (2009).

- "Melasma in Latin America: options for therapy and treatment algorithm". *J. Eur. Acad. Dermatol Venereol* 23: 760–772.
- CESTARI T, PERUZZO J, GIONGO N. (2017). "Definition, Incidence, and Etiology of Melasma in Brown Skin, in: *Melasma and Vitiligo in Brown Skin*". Springer India, New Delhi, pp. 13–19.
- CICHOREK M, WACHULSKA M, STASIEWICZ A, TYMIŃSKA A. (2013). "Skin melanocytes: biology and development". *Postep dermatologii i Alergol* 30:30–41.
- COSTIN GE, HEARING VJ. (2007). "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress". *FASEB J* 21: 976–994.
- D'ELIA MPB, BRANDÃO MC, DE ANDRADE RAMOS BR, DA SILVA MG, MIOT LDB, DOS SANTOS SEB, MIOT HA. (2017). "African ancestry is associated with facial melasma in women: a cross-sectional study". *BMC Med Genet* 18:17.
- DÁVILA YM. (2018). "La importancia del color de piel: caso del venezolano". *Servicio de dermatología de la Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera", Valencia-estado Carabobo*. [Internet]. Disponible en: <http://mriuc.bc.uc.edu.ve/handle/123456789/7407>.
- DEL BINO S, DUVAL C, BERNERD F. (2018). "Clinical and Biological Characterization of Skin Pigmentation Diversity and Its Consequences on UV Impact". *Int J Mol Sci* 19:2668.
- FAJUJYIGBE D, YOUNG AR. (2016). "The impact of skin colour on human photobiological responses". *Pigment Cell Melanoma Res* 29:607–618.
- FERRÁNDIZ F. (2011). "Etnografías contemporáneas", [cchs.csic.es](http://cchs.csic.es).
- GOGLIA L, BERNACCHI G, GIANFALDONI S. (2014). "Melasma: A Cosmetic Stigma During Pregnancy". *J Pigment Disord* 1: 1–4.
- HANDEL AC, MIOT LDB, MIOT HA. (2014). "Melasma: A clinical and epidemiological review". *An. Bras. Dermatol* 89:771–782.
- HERNÁNDEZ-BARRERA R, TORRES-ALVAREZ B, CASTANEDO-CAZARES JP, OROS-OVALLE C, MONCADA B. (2008). "Solar elastosis and presence of mast cells as key features in the pathogenesis of melasma". *Clin Exp Dermatol* 33:305–308.
- ARELLANO I. (2017). "Guías de diagnóstico y manejo de melasma". *Dermatología C* 16:12–23.
- KANG H, SUZUKI I, LEE D, HA J. (2011). "Profiling Shows Altered Expression of Wnt Pathway–and Lipid Metabolism–Related Genes as Well as Melanogenesis–Related Genes in Melasma". *J Invest Dermatol* 131:1692–1700.
- KANG WH, YOON KH, LEE ES, KIM J, LEE KB, YIM H, SOHN S, IM S. (2002). "Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients". *Br J Dermatol* 146:228–37.
- KWON SH, NA JI, CHOI JY, PARK KC. (2018). "Melasma: Updates and perspectives". *Exp Dermatol* 1:1–5.
- LEE AY. (2014). "An updated review of melasma pathogenesis". *Dermatologica Sin* 32:233–239.
- MANZINI JL. (2009). "Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos". *Acta Bioeth* 6:321–334.
- MONTAUDIÉ H, BERTOLOTTO C, BALLOTTI R, PASSERON T. (2014). "Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis". *EMC - Dermatología* 48:1–11.
- NAREA F, VIVAS S, MUÑOZ A. (2015). "Retrieving the absorption coefficient of epidermis in human skin". *Opt Pura y Apl* 48.
- NOUVEAU-RICHARD S, YANG Z, MAC-MARY S, BASTIEN P, TARDY I, BOUILLON C, HUMBERT P, DE LACHARRIÈRE O. (2005). "Skin ageing: A comparison between Chinese and European populations". *J Dermatol Sci* 40:187–193.
- OSBORNE R, TAMURA M, JARROLD B, BASCOM C, ISFORT R, ROCCHETTA H, ALORA-PALLI M, KIMBALL A. (2018). "Multiethnic comparison of facial skin aging". *J Am Acad Dermatol* 79: AB196.
- PARK KC, KANG HY. (2018). "Current Views on Melasma". pp. 167–181.
- PARK KC, KIM I.S. (2017). "Pathogenesis of Melasma, in: *Melasma and Vitiligo in Brown Skin*". Springer. India, New Delhi, pp. 21–31.
- PASSERON T, PICARDO M. (2018). "Melasma, a photoaging disorder". *Pigment Cell Melanoma Res* 31:461–465.
- RIVERA Z, HAGEL L, RIVERA I, OLLARVES V. (2015). "Tratamiento del melasma en pacientes venezolanas utilizando láser Nd: YAG 1064nm en modo Q-switched". *Dermatología Venez* 53.
- ROSTAMI MOGADDAM M, IRANPARVAR ALAMDARI M, MALEKI N, SAFAVI ARDABILI N, ABEDKOUHI S. (2015). "Evaluation of autoimmune thyroid disease in melasma". *J Cosmet Dermatol* 14:167–171.
- SMIT NPM, KOLB RM, LENTJES EGWM, VAN DER MEULEN H, KOERTEN HK, VERMEER BJ, PAVEL S, NOZ K. (1998). "Variations in melanin formation by cultured melanocytes from different skin types". *Arch Dermatol Res* 290:342–349.
- SUGGS AK, HAMILL SS, FRIEDMAN PM (2018). "Melasma: update on management". *Semin Cutan Med Surg* 37:217–225.
- TARVER DENOVA HM, FREDERICK JC. (2005). "The history of Venezuela". Greenwood Publishing Group.
- THEOHARIDES TC, VALENT P, AKIN C. (2015). "Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders". *N Engl J Med* 373:163–172.
- VASHI NA, DE CASTRO MAYMONE MB, KUNDU RV. (2016). "Aging Differences in Ethnic Skin". *J Clin Aesthet Dermatol* 9:31–8.
- VASHI NA, KUNDU RV. (2013). "Facial hyperpigmentation: causes and treatment". *Br J Dermatol* 169: 41–56.
- VERMA K, KUMRE K, SHARMA H, SINGH U. (2015). "A study of various etiological factors in the causation of melasma". *Indian J Clin Exp Dermatology* 1:28–32.

# Lupus eritematoso ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (AAN), anti ADN, anti RNP, anti Sm

**Aniusky Brazón<sup>1</sup>**  
aniuskybrazon@gmail.com

**Jennifer Frias<sup>1</sup>**  
jennimed@hotmail.com

**Nieves González<sup>1</sup>**  
gonzaleznm@gmail.com

**Ricardo Pérez-Alfonzo<sup>1</sup>**  
perezalfonzo.ricardo@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-3661-0885>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica. Sus manifestaciones pueden ser muy variadas y afectar prácticamente la totalidad de los tejidos y órganos. Se ha podido comprobar la existencia de distintos subgrupos clínico-biológicos dentro de la misma enfermedad, que dependen de la edad de inicio, sexo, número de órganos o grado de afectación orgánica, presencia de enfermedad autoinmune asociada, positividad de determinados anticuerpos, cambios hormonales como pubertad o embarazo y la asociación con eventos estresantes cruciales en la vida de los pacientes. Los factores genéticos confieren una predisposición al desarrollo del Lupus eritematoso sistémico (LES), causando una respuesta inmune aberrada. También cambios epigenéticos: fumadores, medicamentos, exposición a la luz ultravioleta, que se superponen a factores genéticos produciendo cambios en personas susceptibles. El diagnóstico clínico debe ser necesariamente apoyado por diversas pruebas de laboratorio, principalmente los auto anticuerpos (auto Ac), como el anticuerpo antinuclear (AAN), anti ADN. .

**Palabras Clave:** lupus; autoinmunidad; anticuerpos antinucleares; epigenética; enfermedad sistémica.

## LUPUS ERYTHEMATOSUS ANTINUCLEAR ANTIBODIES ANA, ANTI DNA, ANTI RNP, ANTI Sm

## ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is the prototype of systemic autoimmune disease. The manifestations can be very varied and affect practically all the tissues and organs. It has been possible to verify the existence of different clinical-biological subgroups within the same disease, which depends on the age of onset, sex, number of organs and degree of organic involvement, presence of associated autoimmune disease, positive of certain antibodies or hormonal changes such as puberty or pregnancy and the association with crucial stressful events in the lives of patients. Genetic factors confer a predisposition to the development of systemic Lupus erythematosus (SLE), causing an aberrated

immune response, also epigenetic changes: smokers, medications, exposure to ultraviolet light that overlap with genetic factors causing changes in susceptible people. The clinical diagnosis must necessarily be supported by various laboratory tests, mainly auto antibodies (auto Ab), such as anti-nuclear antibody (ANA), anti DNA.

**Keywords:** lupus; autoimmunity; antinuclear antibodies; epigenetic; systemic disease.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes son un grupo complejo y heterogéneo de patologías, resultado de la interacción entre factores genéticos, epigenéticos, inmunológicos y medioambientales. Cerca del 5% de la población mundial se ve afectada por enfermedades autoinmunes órgano-específicas y sistémicas (Lleo *et al.*, 2010).

Basados en diferentes modelos de predictibilidad, la presencia de un determinado auto Ac en un individuo posee un rol importante en la evolución de las diferentes enfermedades autoinmunes (Lleo *et al.*, 2010; Tobón *et al.*, 2012)

La Consulta de Lupus Eritematoso LE y otras enfermedades del tejido conectivo del Instituto de Biomedicina Dr Jacinto Convit - Hospital Vargas de Caracas, fue creada en el año 1989, con el fin de cubrir una necesidad de nuestros pacientes en el estudio, diagnóstico y tratamiento de las diversas colagenopatías. Entendiendo la complejidad de este universo de enfermedades autoinmunes, se plantea la necesidad de constituir un equipo de especialistas multidisciplinario incluyendo a la Dermatología, Medicina Interna e Inmunología. Sumando progresivamente especialistas en Patología Bucal. En la actualidad se controlan en esta consulta alrededor de 400 pacientes con un franco predominio en el género femenino de 6:1.

Ante la sospecha diagnóstica de LE sistémico (LES) debe realizarse en todos los pacientes: una historia clínica y exploración física completa. Analítica general: VSG, hemograma completo, bioquímica estándar (glucosa, creatinina, BUN, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, GOT, GTP, GGT, FA, bilirrubina, LDH, CPK, proteínas, albumina, sodio, potasio, calcio y fosforo, pruebas de coagulación (PT, PTT) sedimento urinario y proteinuria en 24 h. La

determinación de anticuerpos antifosfolípidicos: VDRL, anticuerpos anticardiolipinas (AAC), anti  $\beta$  2 glicoproteína I, se indica en pacientes con alta sospecha de síndrome antifosfolípido (con clínica característica de trombosis y abortos espontáneos a repetición).

El perfil inmunológico básico realizado en nuestros pacientes consiste en: anticuerpos antinucleares (AAN), anticuerpos anti-ADN, anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo anti-ENA: Sm, RNP, Ro, La, fracciones C3, C4 y CH50 del complemento y determinación de factor reumatoide.

Los auto Ac encontrados en las enfermedades autoinmunes son el resultado de errores en los mecanismos de regulación o de un aumento considerable en los autoantígenos por alteración en los mismos mecanismos. Dentro del gran abanico de auto Ac estudiados, en la práctica clínica estos tienen un importante rol como marcadores de autoinmunidad y de diagnóstico. De este grupo de pruebas, muy pocas son indicadores de actividad del LES. Como lo son los anticuerpos anti-ADN de cadena doble (ADNcd) (Aggarwal, 2014).

## ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (AAN)

Se presentan en el suero de pacientes con enfermedades de origen inmunológico, como LES, síndrome de Sjögren (SS), esclerodermia sistémica progresiva (ESP) y polimiositis (PM). Hargraves y colaboradores, en 1948, describieron en la médula ósea de una paciente con LE, la *célula LE* y su relación con el LES. 10 años más tarde Kunkel, demuestra que la presencia del fenómeno LE era debida a la interacción de factores séricos, anticuerpos y determinados elementos nucleares antigénicos como el ADN (Fernández *et al.*, 1976; Fong *et al.*, 1989).

La detección de las *células LE* fue durante mucho tiempo una prueba utilizada para confirmar el diagnóstico de LES. Sin embargo, años después, se demostró su baja especificidad, ya que pueden estar presentes en pacientes con artritis reumatoide (25%), SS (15–20%), cirrosis hepática (33%), hepatitis crónica activa (50–70%) y en otras enfermedades como miastenia gravis y púrpura trombocitopénica idiopática (1–2%). Friou y colaboradores utilizaron la

inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la identificación clásica de AAN, lo que inició una nueva era de correlaciones clínico-serológica en las enfermedades sistémicas autoinmunitarias como el LES (Bologna *et al.*, 2004).

La presencia de AAN puede ser detectada en diferentes enfermedades autoinmunes, así como también en personas sanas. Sin embargo, el grupo donde han alcanzado más significación, tanto por su mayor porcentaje de positividad como por sus implicaciones clínicas es en las enfermedades sistémicas autoinmunes del tejido conectivo y en particular en el LES, la esclerodermia, las miopatías inflamatorias idiopáticas, el SS y la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC).

### **Detección y significado de los AAN**

La detección de los AAN identifica anticuerpos presentes en el suero, que se unen a autoantígenos del núcleo de las células de los mamíferos. Las técnicas actualmente utilizadas, en la mayoría de los laboratorios clínicos, usan como sustrato líneas de células tumorales humanas, las Hep-2. Los auto Ac se detectan mediante anti-suero conjugado con fluorocromo específico contra la inmunoglobulina humana (el anticuerpo) que se une al núcleo de las células, el sustrato. Las técnicas iniciales utilizaban las células de roedores, desconociéndose para ese momento que el núcleo de éstas carece de algunos de los autoantígenos presentes en el de las células humanas. Como consecuencia, algunos de los sueros de pacientes con LES, especialmente los que contenían auto AC anti-Ro, eran negativos en las pruebas de AAN al utilizar células de roedores. En la actualidad, usando como sustrato líneas de células humanas tumorales como Hep-2, sólo el 1-2% de los pacientes con LES tienen falsos negativos de AAN (Bologna *et al.*, 2004).

La identificación de los AAN se utiliza para el diagnóstico de LES, siendo la sensibilidad del 98% y la especificidad del 90%. Sin embargo, en individuos no seleccionados, el valor predictivo positivo es del 30-40%, mientras que el valor predictivo negativo es > 99%. Aproximadamente dos tercios de los AAN positivos que se ven en la población general no se

asocian a LES y sólo un porcentaje bajo de personas con AAN negativos padecerá LES.

La presencia aislada de AAN, sin manifestaciones clínicas acompañantes no puede utilizarse como criterio diagnóstico, sólo indica la necesidad de un seguimiento estricto del paciente (Pisetsky, 2019).

### **Valores de AAN “normales” frente a “anormales”**

El título de AAN que se considera anormal, varía considerablemente según el método que se use para realizar e interpretar la prueba. Los equipos comerciales más utilizados actualmente en los laboratorios consideran positivos (anormal) los títulos de 1:40 o 1:80 (intentando conseguir de esta manera una alta sensibilidad a la hora de detectar enfermedades autoinmunes). Sin embargo, con estos cortes tan bajos se generan muchos resultados positivos sin significado clínico. Numerosos estudios han comparado los valores presentados por una población con LES con los de un grupo control y han demostrado que un título de 1:160, utilizando como sustrato una línea de células tumorales humanas, tiene poca utilidad. Algunos individuos sanos pueden presentar niveles “anormales” de AAN.

Aproximadamente el 5% de los individuos y jóvenes sanos presentan un título igual o mayor de 1:80. Los títulos de AAN superiores a 1:80 se consideran como un resultado positivo. Títulos altos ( $\geq 1:640$ ) son sugestivos de LES. La solicitud de la prueba se debe sustentar con la sospecha clínica. Los AAN, por si solos, no deben usarse como prueba de cribado de las colagenopatías. En los pacientes con sintomatología autoinmune poco definida, los AAN positivos no constituyen un elemento decisivo para el diagnóstico (Pisetsky, 2019).

### **Significado clínico de los patrones de IF de los AAN**

La positividad de los AAN se manifiesta con diferentes patrones de IF nuclear, como son: homogéneo o difuso, periférico o en reborde, nucleolar, centromérico y moteado (Bologna *et al.*, 2004).

- **Patrón homogéneo:** se caracteriza por una tinción

homogénea en el núcleo, cuya intensidad puede variar dependiendo de la concentración de los anticuerpos presentes en el suero (Bologna *et al.*, 2004).

- **Patrón de AAN periférico (en reborde):** Con tinción regular alrededor del núcleo, sugiere la presencia de anticuerpos contra el ADNcd, indicativos de LES (Bologna *et al.*, 2004).

- **Patrón de fluorescencia nuclear centromérico:** específico de los anticuerpos que se unen a los componentes de polipéptidos de los centrómeros cromosómicos por ejemplo CENP-B. Estos anticuerpos se producen sobre todo en los pacientes con esclerodermia sistémica (Bologna *et al.*, 2004).

- **Patrón nucleolar:** se encuentra en auto Acs contra moléculas procesadoras de ARN ribosomal como la fibrilarina, y puede asociarse a la presencia de esclerodermia (Bologna *et al.*, 2004).

- **Patrón moteado a título alto:** sugiere la presencia de auto Ac contra la ribonucleoproteína (RNPU1) presente en la superposición de enfermedades autoinmunitarias del tejido conectivo como ocurre en la EMTC. También se asocian a auto Acs anti-ENA (Ro/SSA, La/SSB, Sm, RNP, Scl-70 y Mi-2) (Bologna *et al.*, 2004).

### **Técnicas utilizadas para la detección de auto Ac**

En el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes la detección de auto Acs es de gran utilidad, permitiendo identificar por variadas técnicas los diversos antígenos específicos reconocidos. Este tipo de técnicas han evolucionado de manera importante en las últimas décadas, desarrollándose cada vez pruebas con mayor especificidad y sensibilidad (Hernández *et al.*, 2009).

Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

- **IFI:** técnica de primera elección para detectar AAN, se basa en el reconocimiento de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas. Su sensibilidad y especificidad hacen que sea altamente adecuada, constituyendo una prueba con bastante solidez diagnóstica. Se realiza sobre cortes congelados de hígado o riñón de rata o monocapas de

células tumorales mantenidas en cultivo (HEP-2). La diferencia entre estos dos tipos de sustratos antigénicos radica en la cantidad de antígenos nucleares que tienen y por consiguiente la posibilidad de detectar o no un anticuerpo en el suero del paciente con enfermedad autoinmune (Cabiedes *et al.*, 2010).

- **ELISA:** técnica utilizada para la identificación o confirmación de los anticuerpos AAN presentes en los pacientes con enfermedades autoinmunes. Se utiliza la técnica de ELISA indirecta, con el reconocimiento de los anticuerpos específicos presentes en las muestras de los pacientes, mediante un anticuerpo dirigido contra la región Fc humana de cualquier isotipo (IgG, IgM o IgA). Los anticuerpos anti-Fc están unidos a enzimas como la peroxidasa. Los antígenos utilizados en las placas de ELISA pueden ser nativos, recombinantes o sintéticos. La técnica puede ser cualitativa o cuantitativa si se requiere conocer la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras (Cabiedes *et al.*, 2010).

- **Electroinmunotransferencia (EIT) o Western blot:** es una técnica con múltiples usos; entre ellos la detección de actividad contra componentes celulares. Es altamente sensible y específica y su uso está enfocado principalmente a investigación, debido a su costo, tiempo de preparación del ensayo, tiempo de desarrollo y número de muestras que se pueden correr al mismo tiempo. Sin embargo, recientemente algunas compañías están comercializando equipos para uso en laboratorios de diagnóstico. La detección de AAN mediante EIT permite identificar una gran cantidad de autoantígenos. Existen auto Ac que reconocen solo la forma nativa de las proteínas del centrómero en células HEP-2 y no las formas desnaturalizadas o modificadas obtenidas con frecuencia en la EIT. Lo cual confirma que existen anticuerpos que reconocen epítomos conformacionales de los antígenos (Cabiedes *et al.*, 2010).

- **Microinmunoensayos enzimáticos y técnicas luminométricas de detección múltiple (tecnología de perfil multi-analítico xMAP):** son otras técnicas que se están empleando actualmente para la detección de AAN. Son capaces de detectar múltiples antígenos en un sólo ensayo (Cabiedes *et al.*, 2010).

## **Importancia clínica de los AAN y otros auto Ac específicos en pacientes con LES**

Los AAN forman parte junto con otros auto Ac, de los criterios diagnósticos para la clasificación de LES de la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR), el Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Aringer *et al.*, 2019) y las Clínicas Internacionales Colaboradoras de Lupus Sistémico (SLICC) del 2012 (Tan *et al.*, 1982; Yu *et al.*, 2014).

Los títulos de AAN no están correlacionados con la actividad y la gravedad de la enfermedad. La mayoría de los auto Ac sirven para diagnosticar una enfermedad autoinmune. Por ejemplo, los anti-Sm son muy específicos de LES y por tanto de considerable utilidad para su diagnóstico. Sin embargo, su presencia no guarda relación con la actividad de la enfermedad y tampoco tiene sentido hacer determinaciones frecuentes de los títulos de AAN para monitorizar la actividad. La presencia de algunos auto Acs ayudan en el diagnóstico, actividad y seguimiento de la enfermedad como los anti-ADNcd. (Bologna *et al.*, 2004; Rodsaward *et al.*, 2019).

### **Anticuerpos anti-ADNcd**

Los anticuerpos anti-ADN son inmunoglobulinas dirigidas contra el ADN puro o en complejo con proteínas como las histonas. Constituyen un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas que tienen distintas especificidades, y se clasifican en anti-ADN de cadena simple (anti-ADNcs) y anti-ADNcd (Rodsaward *et al.*, 2019).

Los anticuerpos anti-ADNcd tienen mucha importancia, su elevación se correlaciona positivamente con la actividad de LES (especialmente cuando se asocian a la disminución de los niveles de complemento) y pueden reflejar un mayor riesgo de padecer nefritis lúpica (Aggarwal *et al.*, 2014; Bologna *et al.*, 2004; Mendez *et al.*, 2018).

Las técnicas de identificación de los anticuerpos anti-ADN más utilizadas son la IFI utilizando el organismo flagelado *Crithidia lucillae* como sustrato, ensayo que se fundamenta en el reconocimiento de los anticuerpos que reaccionan contra el ADNn de la mitocondria gigante

(Cinetoplasto) del parásito *Crithidia lucillae* (CLIFT). Esta técnica tiene alta especificidad aunque baja sensibilidad y confirma el diagnóstico de LES (Smeenk *et al.*, 1991; Bizzarro *et al.*, 2012).

### **Inmunoprecipitación de FARR o radioinmunoanálisis (RIA) Y ELISA**

La inmunoprecipitación de FARR usada también para detectar anticuerpos anti ADN, se basa en la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno marcado con un isótopo radioactivo. Se incubaba el ADN marcado con el suero del paciente y se forman complejos ADN-anti-ADN y se precipitan dichos complejos con sulfato de amonio (FARR clásico) o con polietilenglicol (FARR modificado). El marcado con isótopos permite cuantificar el anticuerpo unido (Bologna *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2018).

La utilidad clínica del anti-ADNcd se fundamenta en el apoyo diagnóstico frente a un paciente con sospecha de LES, como método de seguimiento o como marcador de futuras recaídas de la enfermedad. Por lo anterior, un paciente con sospecha de LES y con un resultado de AAN positivo requiere de una prueba de especificidad en el que se evalúen anticuerpos anti-ADNcd, los cuales pueden estar presentes en el 60-83% de los pacientes con LES y la asociación de la actividad de la enfermedad, con la nefritis lúpica, compromiso hepático o neurológico. Los anticuerpos anti-ADNcd tienen una gran importancia en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LES dada su alta especificidad (>95%) (Méndez *et al.*, 2018).

### **Anticuerpos anti-NUCLEOSOMAS (anti-NUC)**

Los anticuerpos anti-NUC son autoanticuerpos dirigidos contra epítomos de histona expuestos en la cromatina, contra ADNcd y contra epítomos conformacionales creados por la interacción entre ADN de doble cadena e histonas. Se ha demostrado que los anticuerpos anti-NUC representan un excelente marcador serológico para el diagnóstico de LES. Los anticuerpos Anti-NUC juegan un papel importante en la patogénesis del LES, especialmente en el desarrollo de nefritis. Representan un rol

fundamental en el desarrollo de lesiones renales al mediar la unión de los auto Ac a la membrana basal. El método usado para la medición de estos anticuerpos es ELISA (Bizzarro *et al.*, 2012; Saigal *et al.*, 2013).

A pesar de que los anti-ADNcd son los mejores estudiados y usados para el diagnóstico y correlación con la actividad de LES, se ha sugerido que los anti-NUC son tan buenos o mejores que los anti-ADNcd para diagnosticar LES por su mayor sensibilidad y valor pronóstico (Bizzarro *et al.*, 2012; Saigal *et al.*, 2013).

### **Anticuerpos anti -ribonucleoproteínas anti-RNP / anti Sm**

Los anticuerpos contra antígenos RNP y anti Sm reconocen proteínas que se asocian con una o dos moléculas distintas de ARN para formar ribonucleoproteínas nucleares pequeñas de RNP (snRNP). Los anticuerpos anti-RNP reaccionan con proteínas (70 KD, A, C) que están asociadas con el U1-ARN y forman U1snRNP. Los anticuerpos anti-RNP están dirigidos hacia epítomos tanto discontinuos como lineales que están contenidos en la secuencia de las proteínas (70 KD, A y C), mientras que los anticuerpos anti-Sm reaccionan predominantemente con proteínas (B', B y D) (Migliorini *et al.*, 2005).

Los ensayos para detectar anticuerpos anti-RNP son: contrainmunolectroforesis (CIE), inmunotransferencia y ELISA. Los anti-RNP son detectables en 25 a 47% de los pacientes con LES. Los títulos altos de anticuerpos anti-RNP son diagnósticos de EMTC, especialmente cuando se ha descartado la presencia de algún otro auto Ac. La medición de los anticuerpos anti-RNP es más importante en el diagnóstico de LES que en el seguimiento de los pacientes. Los anti-RNP son frecuentes en pacientes con el fenómeno de Raynaud y esclerodermia (Bizzarro *et al.*, 2012; Migliorini *et al.*, 2005).

Los anticuerpos Anti Sm (anti-Smith) y RNP están muy relacionados. El anticuerpo anti-Sm es una inmunoglobulina dirigida contra snRNP que forman parte del espliceosoma (complejo multiproteico encargado del empalme del ARN). Este es el anticuerpo más específico para LES, con una

especificidad cercana al 97%. Sin embargo, solo son detectables en el 25-30% de los pacientes con esta enfermedad, por lo que su ausencia no descarta la misma. Casi siempre se asocian con anti-RNP y en los pocos casos en los que se detecta inicialmente solo anti-Sm, el anti-RNP se desarrolla más tarde en el curso de la enfermedad. Por su alta especificidad en Lupus, está incluido dentro de los criterios de SLICC y del ACR. En la mayoría de los casos estos anticuerpos se encuentran positivos junto con los anti-RNP (Migliorini *et al.*, 2005).

Inicialmente se creía que los anti-Ro (SS-A) y anti-La (SS-B) reaccionaban exclusivamente contra las ribonucleoproteínas (RNP) citoplasmáticas y se denominaron auto Ac citoplasmáticos. Sin embargo, se ha demostrado que éstos reaccionan con proteínas presentes en las RNP del citoplasma humano (RNPhY) que se encuentran también en el núcleo. Las proteínas Ro y La son antígenos relacionados, que virtualmente están presentes en las mismas partículas de RNP. Por tanto, una respuesta autoinmunitaria contra uno de éstos, con frecuencia afectará también al otro. Esto explica que cuando un individuo desarrolla uno de estos auto Ac, es frecuente que el otro también esté presente. Los anti-Ro pueden aparecer aisladamente; sin embargo, es poco frecuente que los anti-La aparezcan sin que haya un anti-Ro positivo (Bolognia *et al.*, 2004).

### **Anticuerpo anti-Scl 70 o Ac antitopoisomerasa I**

Son proteínas cromosómicas, caracterizadas por estar dirigidos contra una proteína nuclear no histona de 70 KD. Producen un patrón nucleolar o moteado fino mediante la medición de AAN por IFI. Su importancia clínica radica en encontrarse en pacientes con esclerosis sistémicas en sus formas difusas en un 40-64%. Ha sido asociado a otras manifestaciones con mayor prevalencia como fibrosis pulmonar y síntomas intestinales. Este anticuerpo está asociado a mal pronóstico y mayor mortalidad debido a insuficiencia cardíaca derecha secundaria a fibrosis pulmonar y enfermedad intersticial pulmonar (Méndez *et al.*, 2018).

## AAN/LES inducido por fármacos

Numerosos fármacos son capaces de desencadenar la producción de AAN y LES. En esta lista creciente, destacan: procainamida, hidralacina, isoniacida, clorpromacina, fenitoína, metildopa, minociclina. Los pacientes con LES inducido por fármacos raramente presentan manifestaciones cutáneas específicas de lupus, predominando las manifestaciones clínicas musculoesqueléticas (artritis, artralgiás, mialgias) y la serositis (pleuritis, pericarditis). La afección de la piel se ve con menor frecuencia que en el LES clásico. Los anticuerpos anti-histonas son un marcador serológico de los AAN inducidos por fármacos y la forma clásica de LES inducido por fármacos. Otros fármacos como hidroclorotiazida, diltiazem, griseofulvina, terbinafina, son capaces de desencadenar la producción de auto AC anti-Ro y lesiones cutáneas de lupus eritematoso cutáneo subagudo (Bologna *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

Los AAN son inmunoglobulinas que reconocen componentes autólogos del núcleo y del citoplasma de la célula. La determinación de AAN mediante IFI es la principal prueba cuando se sospecha de enfermedades autoinmunes. La presencia de AAN puede no ser autoinmune, también pueden ser naturales o infecciosos. La definición de los diferentes patrones de AAN, por IFI con células HEP-2 debe incluir el análisis de células en interfase y células en división. Los patrones más frecuentes en LES son periférico y homogéneo.

Los parámetros a tomar en cuenta en la lectura de los resultados de la IFI son: positividad de los AAN, titulación y patrón. La determinación de los AAN tiene una finalidad diagnóstica y pronóstica. Los Ac anti-ADNcd son los únicos útiles para monitorizar la actividad del LES. El anticuerpo anti-Sm es altamente específico para el LES. La ausencia del mismo no excluye la enfermedad.

## REFERENCIAS

AGGARWAL A. (2014). "Role of autoantibody testing". *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28: 907-920.

- ARINGER M, COSTENBADER K, DAIKH D, BRINKS R, MOSCA M, RAMSEY R, SMOLEN J. (2019). "2019 European league against rheumatism/american college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus". *Arthritis Rheumatol* 71: 1400-1412.
- BIZZARRO N, VILLALTA D, GIAVARINA D, TOZZOLI R. (2012). "Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and study of metanalysis". *Autoimmun Rev* 12: 97-106.
- BOLOGNIA J, JORITZZO J, RAPINI R. (2004). "Dermatología". *Editorial Elsevier; 1era Edición; Volumen I, Madrid, España.*
- CABIEDES J, NUÑEZ CA. (2010). "Anticuerpos antinucleares". *Reumatol Clin* 4: 224-230.
- FERNÁNDEZ F, MATTIOLI M. (1976). "Antinuclear antibodies (ANA): immunologic and clinical significance". *Semin Arthritis Rheum* 6:83-124.
- FONG K, BOEY M, HOWE H, FENG P. (1989). "Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus". *Med J Malaysia* 44:151-155.
- HERNÁNDEZ DF, CABIEDES J. (2009). "Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes". *Reumatol Clin* 6: 173-177.
- LLEO A, INVERNIZZI P, GAO B, PODDA ME, GERSHWIN M. (2010). "Definition of human autoimmunity-autoantibodies versus autoimmune disease". *Autoimmun Rev* 9: 259-266.
- MENDEZ T, OCHOA L, POSSO I, ORTIZ E, NARANJO J, TOBÓN G. (2018). "Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas". *Rev Colomb Reumatol* 16: 112-125.
- MIGLIORINI P, BALDINI C, ROCCHI V, BOMBARDIERI S, (2005). "Anti-Sm and anti-RNP antibodies". *Autoimmunity* 38: 47-54.
- PISETSKY DS. (2019). "Evolving story of autoantibodies in systemic lupus erythematosus". *J Autoimmunity* 110: 1-10.
- RODSA WARD P, CHOTTA WORN SAK N, SUWANCHOTE S, RACHYON M, DEEKAJORNDECH, WRIGHT HL, EDWARDS SW, BERESFORD MW, RERKNIMITR P, CHIEWCHENGCHOL D. (2019). "The clinical significance of antinuclear antibodies and specific autoantibodies in juvenile and adult systemic lupus erythematosus patients". *Asian Pac J Allergy Immunol* 1: 1-7.
- SAIGAL R, GOYAL L, AGRAWAL A, MEHTA A, MITTAL P, YADAV RN, MEENA PD, WADHVANI D. (2013). "Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker and its comparison with anti-dsDNA antibody". *J Assoc Physicians India* 61: 372-377.
- SMEENK R, VAN DER H, BRINKMAN K, TERMAAT R, BERDEN J, SWAAK A. (1991). "Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value". *Rheumatol Int* 11: 101-107.
- TAN M, COHEN A, FRIES J, MASI A, MCSHANE D, ROTHFIELD N, SCHALLER J, TALAL N, WINCHESTER R. (1982). "The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus". *Arthritis Rheumatol* 25: 1271-1277.
- TOBÓN GJ, PERS JO, CAÑAS CA, ROJAS A, YOUINOUP, ANAYA JM. (2012). "Are autoimmune diseases predictable?". *Autoimmun Rev* 11: 259-66.
- YU C, GERSHWIN ME, CHANG C. (2014). "Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus". *J Autoimmunity* 48-49: 10-13.

# Estrategias de análisis por citometría de flujo de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis cutánea Americana

Orquídea L. Rodríguez<sup>1</sup>

orquileo@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-3841-4500>

Martín A. Sánchez<sup>1</sup>

martinsanchez1@gmail.com

Félix J. Tapia<sup>1</sup>

ftapia@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela - Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

La Leishmaniasis cutánea americana (LCA) presenta distintas formas clínicas activas con diferentes grados de severidad: cutánea localizada (LCL), difusa (LCD), cutánea mucosa (LCM) e intermedia (LCI). Las células dendríticas (CDs) están involucradas en el inicio y regulación de la respuesta inmunitaria protectora frente al parásito *Leishmania*, por lo cual su determinación es importante para comprender la inmunopatología relacionada con esta enfermedad y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. El objetivo de este trabajo fue estandarizar la estrategia de análisis por citometría de flujo, para medir la frecuencia y grado de maduración/ activación de las CDs circulantes de pacientes con LCA y sujetos sanos. El marcaje de inmunofluorescencia directa se realizó a 22 muestras de sangre completa con anticuerpos acoplados a fluorocromos: Lin-1-FITC, HLA-DR-PerCP, CD11c-FITC, CD123-PE, CD86-APC, CD83-APC. Las CDs se distinguieron entre las HLA-DR<sup>+</sup> Linaje: la expresión de CD11c definió a CDs mieloides (CDsM) y CD123 a CDs plasmocitoides (CDsP). El grado de maduración y activación fue de acuerdo a CD86 y CD83, respectivamente. Las CDsM y CDsP eran mayores en los pacientes LCL comparado con control y pacientes LCI y LCD ( $p<0,05$ ). La relación CDsM/CDsP en pacientes LCI (10,5) fue mayor que en controles (7,47), LCL (7,06) y LCD (6,38). Los LCL tenían mayor proporción de CDsM CD83<sup>+</sup> que controles, LCI y LCD ( $p<0,05$ ). La estrategia de análisis por citometria de flujo empleada nos permitió evaluar este grupo celular tan importante en la respuesta inmune frente a infecciones.

**Palabras Clave:** Células dendríticas; Inmunofluorescencia; Citometría de flujo; Leishmaniasis cutánea americana.

## FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS STRATEGIES OF DENDRITIC CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS

### ABSTRACT

American cutaneous Leishmaniasis (ACL) presents different active clinical forms with different degrees of severity: cutaneous (LCL), diffuse (DCL), mucocutaneous (MCL) and intermediate (ICL). Dendritic cells (DCs) are

involved in the initiation and regulation of the protective immune response against the *Leishmania* parasite, therefore determination of DCs is important to understand the immunopathology related to this disease and the development of new therapeutic alternatives. The objective of this work was to standardize the analysis strategy by flow cytometry, to measure the frequency and degree of maturation/activation of circulating DCs from patients with ACL and healthy subjects. Direct immunofluorescence labeling was performed on 22 whole blood samples using fluorochrome-coupled antibodies: Lin-1-FITC, HLA-DR-PerCP, CD11c-FITC, CD123-PE, CD86-APC, and CD83-APC. DCs were distinguished between HLA-DR<sup>+</sup> Lineage<sup>-</sup> cells: CD11c expression defined myeloid DCs (DCsM) and CD123 defined plasmacytoid DCs (DCsP). The degree of maturation and activation was defined according to CD86 and CD83 expression, respectively. DCsM and DCsP were higher in LCL patients versus controls, ICL and DCL patients ( $p < 0.05$ ). The DCsM/DCsP ratio of ICL (10.5) was higher than in controls (7.47), LCL (7.06) and DCL (6.38). LCL had a higher proportion of DCsM CD83<sup>+</sup> than controls, ICL and DCL ( $p < 0.05$ ). Our flow cytometric analysis strategy allowed evaluating this important cell group in the immune response against infections.

**Keywords:** Dendritic cells; Immunofluorescence; Flow cytometry; American cutaneous Leishmaniasis.

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad inflamatoria crónica que comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas; desde úlceras cutáneas hasta infecciones viscerales fatales, considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades parasitarias más importantes con aproximadamente 350 millones de individuos en riesgo de contraerla, siendo la incidencia y prevalencia anual estimada de 600.000 y 12 millones de pacientes, respectivamente (Ashford *et al.*, 1992; Desjeux, 2004). En las Américas se reportaron 989.096 casos de Leishmaniasis Cutánea entre 2001 y 2018 con un promedio anual de 54.950 casos (Organización panamericana de la salud, OPS, 2019).

La leishmaniasis cutánea Americana (LCA) presenta distintas formas clínicas activas con diferentes grados de severidad, conocidas como Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) que es la forma menos severa, usualmente limitada a una simple o pocas úlceras en la piel de individuos inmuno-respondedores; Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) es la forma más severa de la enfermedad desarrollada por individuos susceptibles, en los cuales las lesiones son múltiples nódulos no ulcerados y placas;

Leishmaniasis mucocutánea (LCM) y Leishmaniasis cutánea intermedia (LCI) que son formas atípicas de la Leishmaniasis que se localizan en el centro del espectro (Convit *et al.*, 1993).

La inmunopatogénesis de la Leishmaniasis depende de una compleja interacción entre el vector, el parásito y el hospedador (Scott y Novais, 2016). Dentro de los componentes principales de la respuesta inmune contra el parásito figuran las células dendríticas (CDs) que son una familia de células presentadoras de antígenos (CPA) “profesionales”, especializadas en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T (Hart, 1997; Steinman y Hemmi, 2006). El papel de las CDs en la Leishmaniasis ha constituido un punto de fuertes estudios que en conjunto señalan una participación crucial en el inicio y regulación de la respuesta inmunitaria protectora (Flohé *et al.*, 1998; Gorak *et al.*, 1998; Henri *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2002; Prina *et al.*, 2004; Tsagoziz *et al.*, 2004; Soong, 2008; Kautz-Neu *et al.*, 2012; Feijó *et al.*, 2016, Von Stebut y Tenzer, 2018; Dietze-Schwonberg *et al.*, 2018; Tiburcio *et al.*, 2019).

En los últimos años ha cambiado la visión de las células dendríticas como una población homogénea. Diversos estudios han demostrado que existe una variabilidad en la expresión de moléculas estructurales y de activación que colectivamente las diferencia de otros leucocitos y entre ellas, lo cual ha permitido su clasificación según su estado de diferenciación y sus funciones (Henri *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001; Nagai, 2017).

En su estado inmaduro las CDs son capaces de capturar y procesar antígenos en todos los tejidos periféricos no linfoides, expresan ciertos receptores de quimiocinas (por ejemplo, CCR6), receptores lectinas tipo C I y II (BDCA-2,-3,-4; CD205) miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, receptores Fc, receptor de manosa (MR), receptores para proteínas de choque térmico (hsp) y receptores tipo Toll (TLR-2, -3). La expresión de muchos de estos receptores disminuye durante la maduración de la CD, enfatizando su función específica en la captura de antígenos (Kadowaki *et al.*, 2001; Nagai, 2017).

Después del contacto con señales de peligro (patógenos, citocinas proinflamatorias o células necróticas) las CDs migran a las áreas de linfocitos T

de órganos linfoides, donde presentan antígenos a linfocitos T vírgenes y modulan su respuesta. Simultáneamente experimentan un proceso de maduración y modulación de la expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas. Además, este proceso induce el aumento de la producción de una variedad de citocinas, y la expresión de moléculas de coestimulación y adhesión, que promueven colectivamente la interacción CD-linfocito T (Nagai, 2017; Kim y Kim, 2019).

En humanos, se han descrito dos subtipos de CDs en sangre periférica, CDs mieloides (MDCs) y plasmocitoides (PDCs). Estas células difieren ampliamente en muchos aspectos; expresan diferentes patrones de receptores que reconocen patógenos (PRR) y acorde a éstos responden a diferentes antígenos microbianos, producen diferentes receptores de citocinas y como resultado responden a diferentes citocinas, expresan diferentes citocinas en respuesta al mismo estímulo y finalmente difieren ampliamente en la capacidad de migrar frente a estímulos antigénicos, aunque el patrón de expresión de receptores para quimiocinas es similar (Jarrossay *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001; Collin y Bigley, 2018). Estas diferencias inscriben los diferentes roles de las MDCs y PDCs en la inducción y regulación de la respuesta inmunitaria.

En virtud de la plasticidad fenotípica de las CDs, de su estado de activación y su localización en tejidos periféricos, constituyen las principales células que dirigen la respuesta inmunitaria frente a patógenos intracelulares cuya puerta de entrada es la piel. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que son esencialmente flexibles a las señales de peligro y por ende, pueden promover diferentes fenotipos de linfocitos T (Th1, Th2 o Treg) (Kushwah y Hu, 2011), por lo cual determinar la participación de las diferentes CDs durante la infección por *Leishmania*, es de gran importancia para comprender la inmunopatología relacionada con esta enfermedad y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

Los estudios de CDs han sido obstaculizados por su baja frecuencia en la sangre y los tejidos, por lo cual, la mayoría de los conocimientos sobre las CDs se han obtenido principalmente de estudios de CDs enriquecidas

por centrifugación en gradientes de densidad, cultivo y/o selección negativa (Vremec *et al.*, 1997; Anjuère *et al.*, 1999). Estos procedimientos utilizan las propiedades de densidad y adhesión de las CDs, su crecimiento selectivo en ciertas combinaciones de citocinas, o su falta de expresión de marcadores de linaje de linfocitos, monocitos y granulocitos (Lin) (Vremec *et al.*, 1997). Estos métodos, sin embargo, proporcionan bajo rendimiento y pureza de las CDs, y consumen mucho tiempo. Además, la manipulación puede alterar las células funcionalmente y no permitir la cuantificación de las CDs. Sin embargo, diversos trabajos mostraron la existencia de algunos receptores en la membrana celular de CDs, que ha permitido la caracterización de células no manipuladas (Dzionek *et al.*, 2000, 2001; Patel y Metcalf, 2016).

En la práctica, existen diversas metodologías para el estudio celular. Una de estas, es la Citometría de Flujo, la cual está basada en el concepto general de la unión específica Antígeno-Anticuerpo. El Anticuerpo usado se encuentra conjugado a un fluorocromo específico, que al ser excitado por la acción de un láser, emite una señal de luz en determinado espectro. Esta señal emitida por el fluorocromo es captada por detectores específicos y los datos obtenidos se almacenan en la memoria de un computador y desde allí son pasados a archivos binarios que posteriormente pueden ser analizados (Oughton *et al.*, 2005; Pockley *et al.*, 2015). Existen diversas aplicaciones de la citometría de flujo en el área clínica y de investigación, una de las más comunes es la caracterización de subpoblaciones celulares del sistema inmune.

Debido a las características fenotípicas de las CDs que las distinguen de otras células y entre ellas, y la existencia de anticuerpos específicos contra los marcadores de CDs recientemente identificados, el sistema que emplea la citometría de flujo permitirá la detección simultánea, cuantificación, y el aislamiento de los distintos subtipos de CDs presentes en sangre periférica. El procedimiento de citometría de flujo que se basa en la detección tres o cuatro señales de fluorescencia, es rápido, y permite el uso de pequeños volúmenes de muestra. Esta metodología proporcionaría una herramienta que facilitará futuros estudios para dilucidar el papel de las CDs en la

regulación de la inmunidad durante condiciones fisiológicas y patológicas.

El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar la estrategia de análisis por citometría de flujo para determinar la frecuencia y grado de maduración/activación de las CDs circulantes de pacientes con LCA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestras:** Un total de 24 muestras de sangre completa (5 mL) fueron tomadas por venopunción en tubos con anticoagulante EDTA a pacientes con edades comprendidas entre 20 y 55 años, y con diferentes formas clínicas de Leishmaniasis cutánea: LCL (n=10), LCI (n=5) y LCD (n=1) que acudieron a la consulta de Leishmaniasis y Epidemiología del Instituto de Biomedicina (diagnosticados de acuerdo a los criterios clínicos, epidemiológicos e histopatológicos establecidos por Convit *et al.* (1974), posterior a declaración y firma del consentimiento informado. También se incluyeron 6 controles sanos para comparar la medición de CDs en sangre en condiciones fisiológicas, con los sujetos que presentan LCA.

**Selección de anticuerpos y fluorocromos:** En la actualidad la identificación de CDs en sangre está basada en ciertos criterios de inmuno-fenotipaje. En este trabajo se seleccionó la presencia de HLA-DR, pero como esta molécula es expresada también en otros leucocitos, se escogió para separar las CDs, la ausencia de un panel de antígenos linaje específico de leucocitos (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56). Así, las diferentes subpoblaciones de CDs se distinguieron entre las HLA-DR<sup>+</sup> Linaje<sup>-</sup>, basadas en la expresión de CD11c sobre CDs mieloides y CD123 sobre CDs plasmocitoides. Para esta aproximación de medición de CDs en sangre periférica, se emplearon entonces 4 anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos seleccionados de acuerdo a lo disponible en el mercado y a las combinaciones de anticuerpos necesarias para la definición celular. La detección del grado de maduración y activación de los subtipos de CDs se hizo de acuerdo a la expresión de los receptores de membrana CD86 y CD83. Como se muestra a continuación los fluorocromos incluidos fueron PerCP,

PE, FITC y APC.

**Anticuerpos acoplados a fluorocromos empleados.** Anti-Lin-1 conjugado con FITC (BD Pharmigen), Anti-HLA-DR conjugado con PerCP (BD Pharmigen), Anti-CD11c conjugado con FITC (AbD serotec), Anti-CD123 humano acoplado a PE (BD Pharmigen), Anti-CD86 humano conjugado con APC (BD Pharmigen), Anti-CD83 humano conjugado con APC (BD Pharmigen).

**Caracterización de moléculas de superficie de la membrana celular para determinación de CDs:** El método de marcaje de inmunofluorescencia directa fue el empleado para la enumeración y caracterización de las CDs circulantes. El protocolo consistió en: identificar cinco tubos (**Tubo 1:** Control negativo (sin marcaje), **Tubo 2:** Lin-1 FITC / HLA-DR PerCP, **Tubo 3:** HLA-DR PerCP / CD123 PE/ CD11c FITC, **Tubo 4:** HLA-DR PerCP / CD123 PE / CD83 APC, **Tubo 5:** HLA-DR PerCP / CD11c FITC / CD86 APC), luego se les añadió a cada tubo el anticuerpo monoclonal correspondiente (5 µL de anti-Lin1 y anti-HLA-DR PerCP; 3 µL de anti-CD123 PE, anti-CD11c FITC, anti-CD83/CD86 APC). Posteriormente, se colocaron 200 µL de sangre periférica EDTA a todos los tubos, se mezclaron suavemente y se incubaron en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 500 µL de buffer de lisis a todos los tubos (para eliminar los glóbulos rojos). Se mezcló suavemente con un vortex e incubó 15 min a TA en oscuridad. Se volvió a mezclar y se incubó 15 min. en las mismas condiciones. El sobrenadante se descartó en su totalidad y se lavó con 500 µL de buffer fosfato salino (PBS). El botón celular se mezcló bien con vortex hasta obtener una suspensión homogénea. Finalmente, se añadieron 300 µL de buffer salino con paraformaldehído al 1% (PAF 1%) con el fin de mantener fijadas las células hasta la posterior lectura de la fluorescencia en el citómetro de flujo (BD FACSCanto®). Los tubos fueron almacenados en oscuridad a 4°C bien tapados.

La cantidad de anticuerpo a emplear en el marcaje, se determinó haciendo titulación del mismo según las indicaciones del fabricante (10µL, 5µL, 3µL), escogiéndose el volumen del anticuerpo mínimo que permitiera una separación de las fluorescencias al realizar las combinaciones de colores.

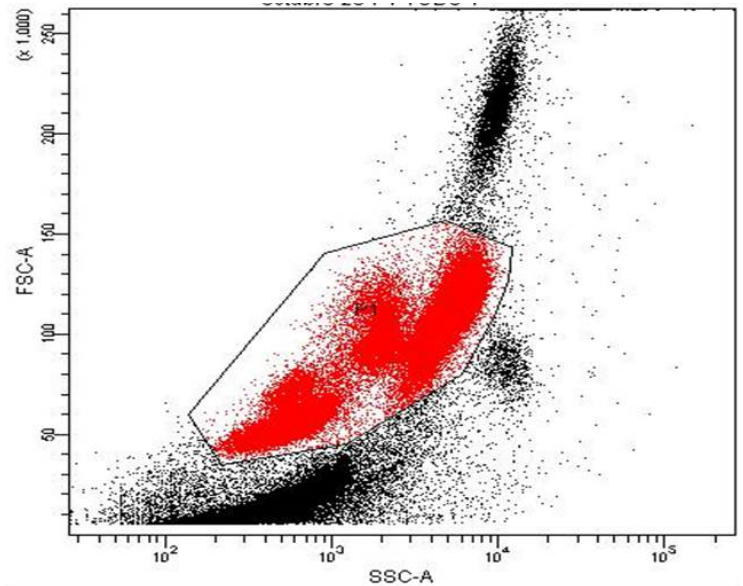
En virtud de la baja proporción de CDs en sangre comparado con el resto de los leucocitos, escogimos un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de sangre y no 50-100  $\mu\text{L}$ , que es lo usualmente empleado para inmunofenotipaje, para asegurar estudiar una cantidad representativa de CDs.

**Adquisición y análisis de los datos.** En primer lugar se realizó una calibración del equipo empleando perlas Calibrite (BD BioSciences) para ajustar los voltajes de los fotomultiplicadores (PMT), compensación de fluorescencia y chequear la sensibilidad del instrumento. Luego, se adquirieron las muestras preparadas para leer la fluorescencia en el citómetro de flujo empleando el software BD FACS-Diva con un umbral (threshold) sobre la dispersión frontal (FSC) que excluya los detritos celulares. Debido a la baja frecuencia de las CDs en sangre periférica, la adquisición fue de 100.000 eventos para aumentar la probabilidad de contar más CDs. Para obtener los resultados de la proporción de células que expresan las moléculas evaluadas al igual que la densidad de expresión de las mismas, se analizaron los datos adquiridos con el software BD FACS-Diva diseñando estrategias para la escogencia de las ventanas que representan las diferentes poblaciones celulares. Estas estrategias se describen en la sección de resultados.

## RESULTADOS

**I.- Estrategias para el análisis de los datos adquiridos en el Citómetro de flujo para la valoración de CDs en sangre periférica.** Para evaluar la frecuencia y grado de maduración de las CDs en sangre periférica de los individuos sanos y pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana empleando citometría de flujo, se siguieron las siguientes estrategias de análisis:

- 1.- En primer lugar se creó un citograma de dispersión frontal (FCS-tamaño) vs dispersión lateral (SSC-granularidad) de los datos adquiridos con el tubo 1 que no tenía marcaje. Se dibujó una población 1 (P1) para excluir los detritos celulares, seleccionando así los leucocitos (100.000 eventos/ventana) (Figura 1).
- 2.- Para identificar las CDs totales, se usaron los datos adquiridos del tubo 2 para obtener un

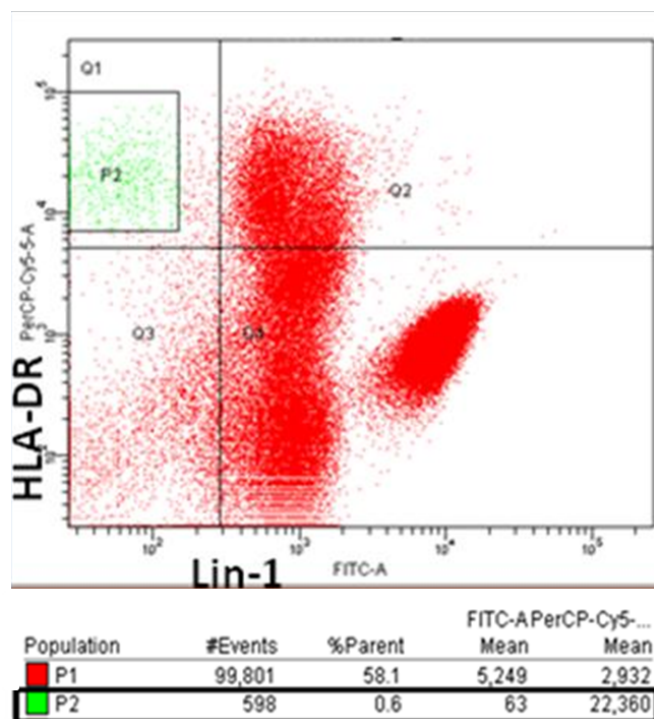


**Figura 1.** Citograma de dispersión (*dot plot* FSC/SSC) obtenido por citometría de flujo de sangre periférica. Se muestra el 100% de los eventos adquiridos y la población P1 (eventos en color rojo) que representan el grupo de células mononucleares.

diagrama de dispersión anti-HLA-DR/Lin-1 de la P1. Luego se escogieron los cuadrantes para visualizar los eventos  $\text{lin}^{\text{dim/negativos}}$  y los  $\text{HLA-DR}^+$ , obteniendo así en los cuadrantes Q2 las células que expresan HLA-DR y Lin-1, como los linfocitos B, y en Q1 las células positivas para HLA-DR pero negativas para Lin-1, que son las CDs (Figura 2).

3- Para obtener la frecuencia y grado de maduración/activación de los subtipos de CDs, se realizaron dos tipos de estrategias de análisis de los datos adquiridos con el citómetro de flujo, con el fin de escoger la que mostrase mejor la información y permitiera realizar los estudios estadísticos para establecer las diferencias entre controles y pacientes.

**Análisis 1:** se presentan los valores porcentuales de las CDs en la población P1 que incluye los leucocitos, que como se observa en la Figura 3A es el 61,2% del total de los eventos adquiridos. Con el tubo 3 (HLA-DR PerCP/CD123 PE/CD11c FITC), se crearon los diagramas de fluorescencia anti-HLA-DR/CD123 (Figura 3A) y anti-HLA-DR/CD11c (Figura 3B) de la P1, obteniéndose los subtipos de CDs. Por no contar con el recurso para la adquisición del anti-CD11c conjugado con otro fluorocromo diferente a FITC, no



**Figura 2.** Citograma de fluorescencia obtenido por citometría de flujo de sangre periférica. Las células se caracterizaron empleando anticuerpos anti-HLA-DR acoplado a PerCP y anti-Lin-1 acoplado a FITC. Se muestra el 100% de los eventos adquiridos de la población P1 (color rojo) y la población P3 (color verde) que representan las CDs (células positivas para HLA-DR y negativas para Lin-1).

se pudo realizar la separación de las CDs por ausencia de los marcadores de linaje, por lo cual se acudió a un segundo análisis extrapolando la P2.

Análisis 2: con este análisis se obtuvo la proporción de los subtipos de CDs pero teniendo como población total la P2 extrapolada en un citograma de fluorescencia que solo contempla el marcaje HLA-DR. Para ello, se creó un citograma SSC (granularidad) vs HLA-DR de la P1 conteniendo la población 2 HLA-DR<sup>+</sup> Lin- (P2- color verde) del citograma de fluorescencia anti-HLA-DR/Lin-1 (Figura 4A), con el fin visualizar la P2 y enmarcarla para crear una tercera población que designamos como “enriquecida de CDs” (P3- color azul) (Figura 4B, 4C).

De la población enriquecida (CDs HLA-DR<sup>+</sup> Lin-) se realizaron citogramas de fluorescencia CD11c vs CD123 para obtener los subtipos de CDs (con los datos adquiridos del tubo 3) y citogramas CD123/CD83 (tubo 4) y CD11c/CD86 (tubo 5) para evaluar el grado de

maduración (Figura 5A y 5B).

4- Para determinar la frecuencia de las CDs totales y subtipos, el grado de activación y maduración de las CDs, los datos estadísticos se obtuvieron de los diagramas de fluorescencia que contienen la P1 y P3 (Ver Figuras 3 y 4).

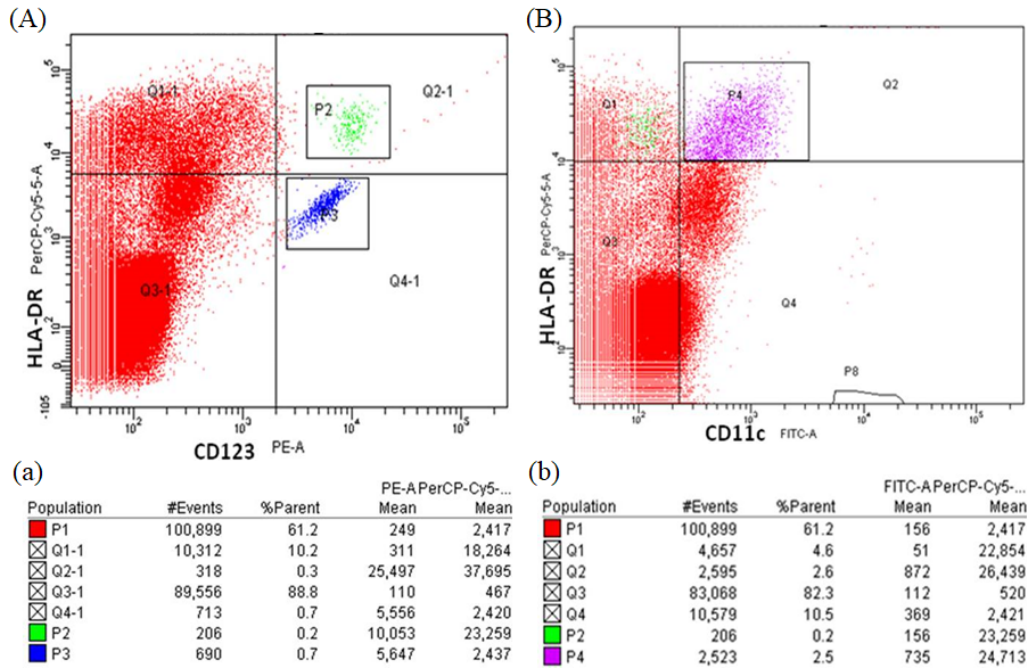
**II.- Células Dendríticas en sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con Leishmaniasis cutánea Americana.** Siguiendo el análisis 2 de los datos obtenidos por el citómetro de flujo, en el figura 6 se muestra la proporción de CDs totales, CDsP y CDsM en los pacientes con LCA y controles. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de CDs totales al comparar grupo control con los pacientes, mientras que las CDsM y CDsP eran mayores en los pacientes LCL cuando se comparó con el grupo control y los pacientes LCI y LCD ( $p < 0,05$ ). La relación CDsM/CDsP del grupo de pacientes LCI (10,5) fue más alta que los controles (7,47), LCL (7,06) y LCD (6,38).

La figura 7 señala la proporción de Células Dendríticas maduras (CD86<sup>+</sup>) y activadas (CD83<sup>+</sup>) en sangre periférica de controles y pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana. En los pacientes con LCL encontramos una mayor proporción de CDsM activadas CD83<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) al comparar con controles, LCI y LCD.

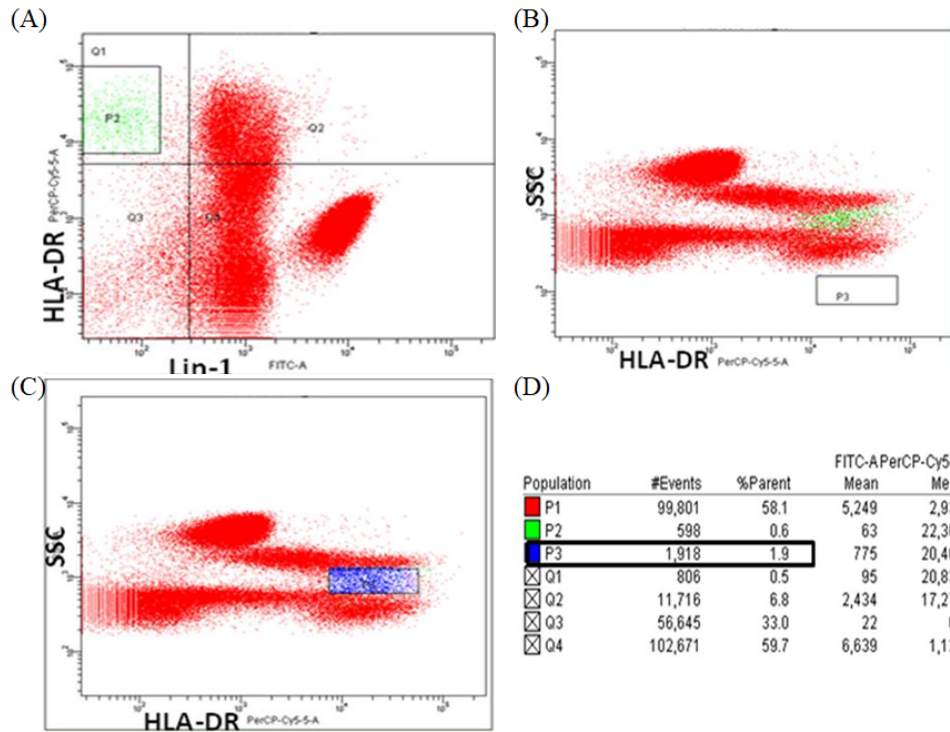
## DISCUSION

El ensayo se diseñó para detectar las dos subpoblaciones de CDs presentes en sangre periférica: CD123<sup>+</sup> (Anti-IL-3R $\alpha$ <sup>+</sup>) y CD11c<sup>+</sup>, y el grado de maduración y activación que ambos grupos presentan en el momento de la evaluación de los individuos en condiciones fisiológicas o patológicas.

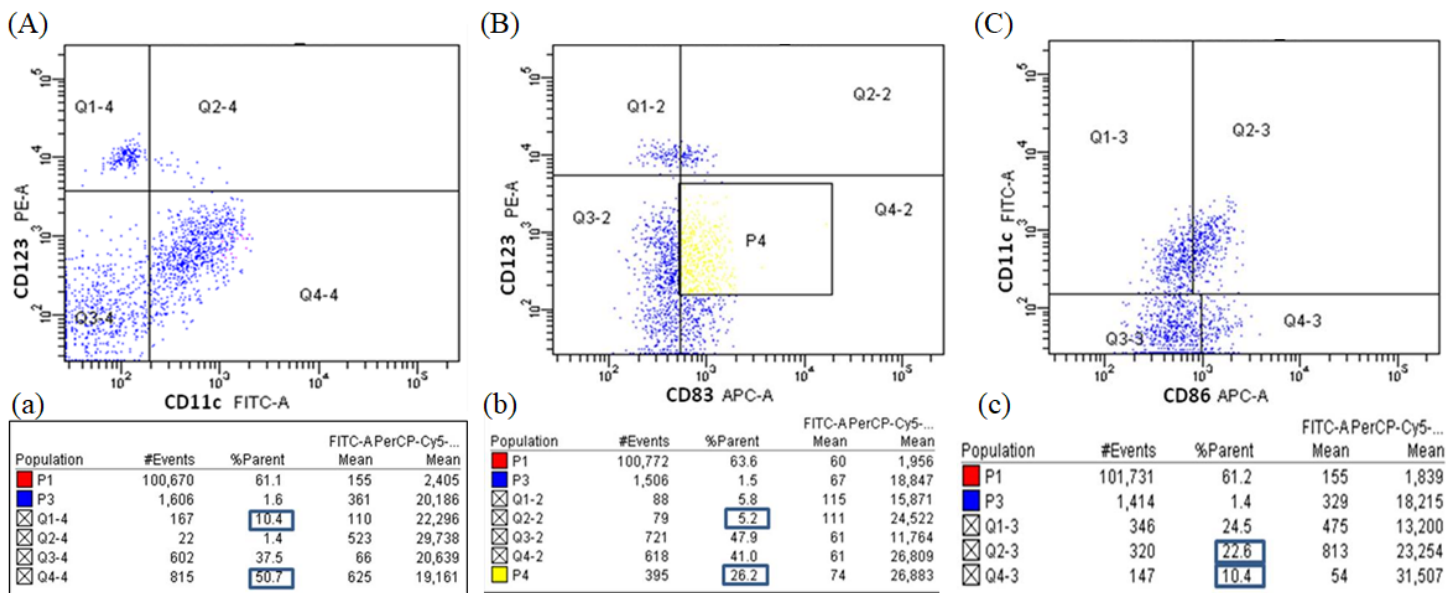
Como fue mencionado anteriormente, estos subtipos de CDs han sido discriminados a través de los receptores de membrana CD11c y el CD123 (Patel *et al.*, 2016), sin embargo, los mismos están expresados en otras células, por lo cual, se empleó una combinación de varios marcadores que incluyeron HLA-DR y Lin-1, aprovechando que las CDs expresan altos niveles de HLA-DR y bajos niveles de los marcadores de linaje de los monocitos, linfocitos y células NK. El Lin-1 utilizado en este ensayo es un



**Figura 3.** Citogramas de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo de sangre periférica. Las células fueron caracterizadas empleando anticuerpos anti-HLA-DR acoplado a PerCP, anti-CD123 PE y anti-CD11c FITC. Se muestra el 100% de los eventos adquiridos. (A) Citograma de fluorescencia anti-HLA-DR/CD123, P2 (color verde)= CDs plasmocitoides (HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup>), P3 (color azul)= Basófilos (HLA-DR<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>) (B) Citograma de fluorescencia anti-HLA-DR/CD11c, P4 (color morado)= CDs mieloides (HLA-DR<sup>+</sup> CD11<sup>+</sup>). (a) y (b) Cuadro de estadística mostrando número de eventos adquiridos (#Events), proporción de células (%Parent) y media de fluorescencia de cada fluorocromo (PE, FITC y PerCP mean).



**Figura 4.** Citogramas de dispersión obtenidos por citometría de flujo de sangre periférica. Se muestra el 100% de los eventos adquiridos. (A) Citograma de fluorescencia anti-HLA-DR PerCP/Lin-1 FITC, P2 (color verde) = CDs totales. (B) Citograma de fluorescencia SSC (granularidad)/anti-HLA-DR PerCP localizando la P2. (C) Citograma de fluorescencia SSC (granularidad)/ anti-HLA-DR PerCP, P3 (color azul)= población enriquecida de CDs HLA-DR<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>. (D) Cuadro de estadística mostrando número de eventos adquiridos (#Events), proporción de células (%Parent) y media de fluorescencia de cada fluorocromo (FITC y PerCP mean).



**Figura 5.** Citogramas de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo de sangre periférica. Las células fueron caracterizadas empleando anticuerpos anti-HLA-DR PerCP, anti-CD123 PE, anti-CD11c FITC, anti-CD83 APC y anti-CD86 APC. Se muestra el 100% de los eventos adquiridos. Citogramas de fluorescencia de P3: (A) Anti-CD123/CD11c, Q1-4= CDs Plasmocitoides (CDsP) y Q4-4= CDs Mieloides (CDsM). (B) Anti-CD123/CD83, Q2-2= CDsP activadas y P4= CDsM activadas. (C) Anti-CD11c/CD83, Q2-3= CDsM maduras y Q4-3= CDsP maduras. (a) (b) y (c) Cuadros de estadística mostrando número de eventos adquiridos (#Events), proporción de células (%Parent) y media de fluorescencia de cada fluorocromo (PE, FITC y PerCP mean).

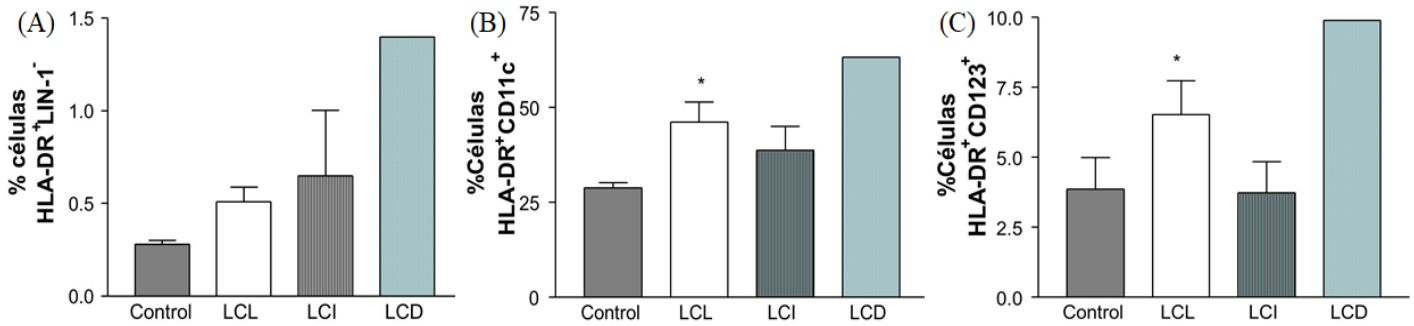
coctel de marcadores de linaje que contiene CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56, conjugados con un solo fluorocromo, lo cual permitió la discriminación entre las otras células mononucleares y las CDs previo a la selección de las CD123<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup>, en un solo tubo y con la misma cantidad de sangre. Con respecto a los leucocitos polimorfonucleares, el análisis permite la identificación de granulocitos basófilos puesto que son linaje negativos y expresan niveles similares de CD123 como las CDs plasmocitoides, pero pudo ser discriminado por la falta de expresión de HLA-DR (Willmann, 2003).

Una desventaja de nuestro sistema de marcaje para determinar la proporción de CDs totales y los subtipos, fue que los anticuerpos Lin-1 y CD11c estaban acoplados al mismo fluorocromo FITC, por lo cual, no se pudo realizar el marcaje directo cuatro colores HLA-DR / Lin-1/ CD123/ CD11c que nos garantizaría la escogencia de una población de CDs completamente exenta de otros leucocitos. Por otra parte, con el avance de los citómetros de flujo y diseños de análisis actualmente se pueden realizar extrapolaciones de regiones o poblaciones en el

análisis (Cossarizza *et al.*, 2017), esto permite ofrecer un discernimiento confiable a través de la selección de una población enriquecida de CDs como fue designada en este estudio, que sería una ventaja para otros centros donde no se puedan adquirir los anticuerpos necesarios.

Las diferencias observadas en los análisis 1 y 2 en cuanto a la proporción de CDsP y CDsM se debe a que en el primer análisis el cálculo de las poblaciones de las CDs circulantes se obtuvo a partir de los leucocitos totales que designa el valor real de estas células en sangre periférica, por eso se obtienen valores porcentuales muy bajos. Mientras que en el análisis 2, el cálculo se realizó con respecto a las CDs definidas por la expresión de receptores específicos, por lo cual, se muestra la proporción de CDsP y CDsM que están en la población enriquecida de CDs.

Otro punto de interés fue determinar el grado de maduración y activación de las CDs en la sangre de los individuos evaluados. Diversos autores han demostrado la expresión de varias glicoproteínas de membrana en las CDs que pasan de un estado inmaduro a uno maduro y/o de activación, como son



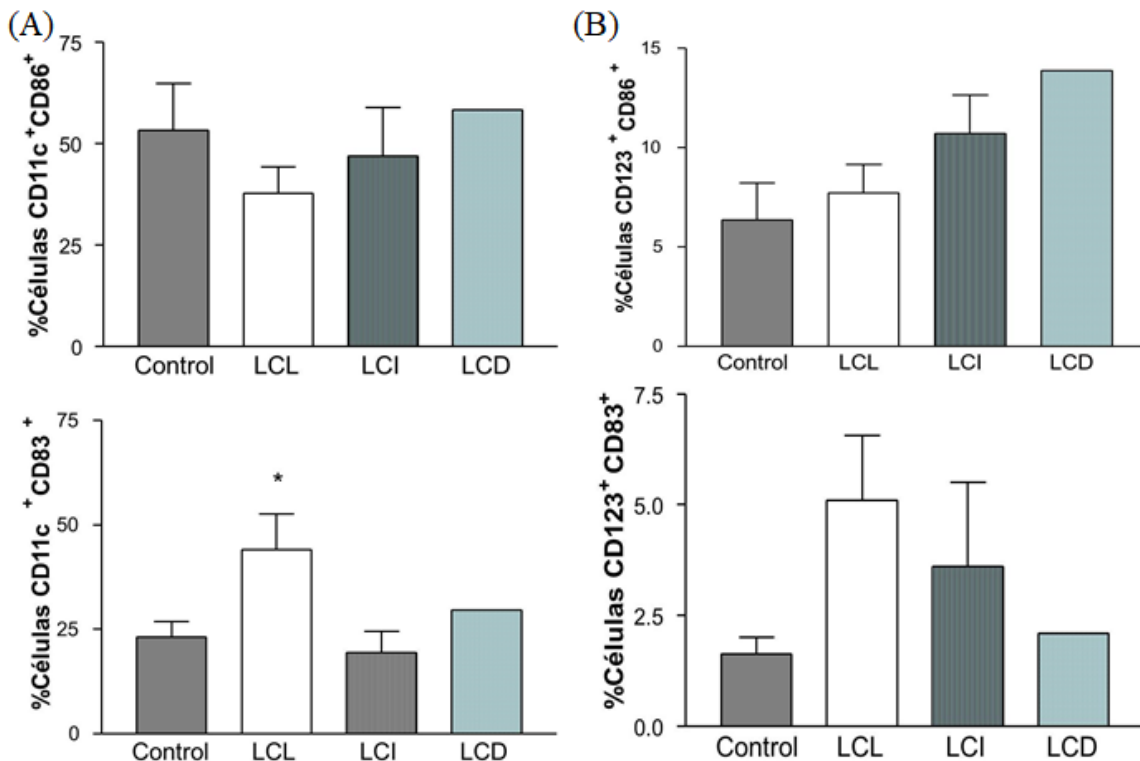
**Figura 6.** Células Dendríticas en sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana. (A) Totales (B) Mieloides- CD11c<sup>+</sup> (C) Plasmocitoides- CD123<sup>+</sup>. LCL: Leishmaniasis cutánea localizada. LCI: Leishmaniasis cutánea intermedia. LCD: Leishmaniasis cutánea difusa. \* $p < 0.05$  en comparación con el control.

las moléculas de co-estimulación (Zhou *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1997). La literatura consultada permitió seleccionar el CD86 y el CD83 para la evaluación de estos aspectos.

Una ventaja de la estrategia de análisis 2 fue que se puede obtener la información de maduración/activación (dos marcadores) de los subtipos de CDs, empleando solo 2 tubos: en el Tubo 4 colocamos CD123 y CD83, pero como los diagramas de fluorescencias se hicieron contemplando la P3

(enriquecida de CDs) el análisis arroja la proporción de CDs CD123<sup>+</sup> CD83<sup>+</sup> (plasmocitoides) y CDs CD123<sup>-</sup> CD83<sup>+</sup> que representa el otro subtipo de CDs (mieloides). En el tubo 5 se caracterizaron las células con CD11c y CD86, obteniendo la proporción de CDs CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> (mieloides) y CDs CD11c<sup>-</sup> CD86<sup>+</sup> (plasmocitoides).

De los datos obtenidos por citometría de flujo se aprecia que existe similar proporción de CDs totales en pacientes con LCA e individuos sanos. Los



**Figura 7.** Células Dendríticas maduras (CD86<sup>+</sup>) y activadas (CD83<sup>+</sup>) en sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana. (A) Mieloides (B) Plasmocitoides. LCL: Leishmaniasis cutánea localizada. LCI: Leishmaniasis cutánea intermedia. LCD: Leishmaniasis cutánea difusa. \* $p < 0.05$  en comparación con el control

pacientes con LCA (LCD>LCL>LCI) tienen más CD<sub>8</sub>M que los controles. La mayor relación de CD<sub>8</sub>M/CD<sub>8</sub>P observada en los LCI con respecto a controles y LCL, pudiera indicar una deficiencia en CD<sub>8</sub>M o un aumento de las CD<sub>8</sub>P en este grupo de pacientes.

Los resultados muestran un mayor número de CD<sub>8</sub>M activadas CD<sub>83</sub><sup>+</sup> en LCL. El CD<sub>83</sub> tiene un papel modulador en la presentación antigénica y generación de linfocitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> (Feilo *et al.*, 2016), por lo que su expresión en CDs de pacientes LCL pudiera asociarse con la resolución de la enfermedad.

La acumulación de CD<sub>8</sub>P ha sido demostrada en la respuesta inflamatoria de varias enfermedades (Galicia *et al.*, 2014; Swiecki y Colonna, 2015). Los pacientes LCI expresan una mayor densidad del factor de coestimulación CD<sub>86</sub> en CD<sub>8</sub>P con respecto a pacientes LCL, sugiriendo su participación en la respuesta inflamatoria exacerbada característica de estos pacientes LCI. Estos resultados conminan a evaluar más detalladamente el papel de las CD<sub>8</sub>P en la inmunopatología asociada a LCI y LCD.

En líneas generales, se logró estandarizar el inmunofenotipaje de CDs en sangre periférica, lo cual representa una excelente herramienta para la evaluación de este grupo celular tan importante en la respuesta inmune que se suscita frente a las infecciones o señales de peligro, al igual que en la inmunotolerancia en ciertas condiciones. Con esta técnica, futuros estudios estarían encaminados a la evaluación de los aspectos funcionales de estos subtipos de CDs en la LCA y en otras enfermedades.

## REFERENCIAS

AGUILAR TORRENTA F, LAMAN JD, VAN MEURS M, ADORINI L, MURAILLE E, CARLIER Y. (2002). "Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice". *Infect Immun* 70(9):5075-80.

ANJUÈRE F, MARTÍN P, FERRERO I, FRAGA ML, del HOYO GM, WRIGHT N, ARDAVÍN C. (1999). "Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse". *Blood* 93(2):590-8.

ASHFORD RW, DESJEUX P, DERAADT P. (1992). "Estimation

of population at risk of infection and number of cases of *Leishmaniasis*". *Parasitol Today* 8(3):104-5.

COLLIN M, BIGLEY V. (2018). "Human dendritic cell subsets: an update". *Immunology* 154(1):3-20.

CONVIT J, PINARDI ME (1974). "Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunopathological spectrum in South America". En: "Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas disease". Ciba Foundation Symposium N° 20 (new series). Amsterdam, Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland. pp. 159-169.

CONVIT J, ULRICH M, FERNÁNDEZ CT, TAPIA FJ, CÁCERES-DITTMAR G, CASTÉS M, RONDÓN AJ. (1993). "The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(4):444-8.

COSSARIZZA A, CHANG HD, RADBRUCH A, AKDIS M, ANDRÀ I, ANNUNZIATO F, BAUER WM. (2017). "Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies". *European Journal of Immunology* 47(10):1584-1797.

DESJEUX P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives". *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27(5):305-18.

DIETZE-SCHWONBERG K, LORENZ B, KOSTKA SL, SCHUMAK B, GESSNER A, VON STEBUT E. (2018). "Insufficient generation of Th17 cells in IL-23p19-deficient BALB/c mice protects against progressive cutaneous leishmaniasis". *Exp Dermatol* 27(1):101-103.

DZIOŃEK A, FUCHS A, SCHMIDT P, CREMER S, ZYSK M, MILTENYI S, BUCK DW, SCHMITZ J. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood". *J Immunol* 165(11):6037-46.

DZIOŃEK A, SOHMA Y, NAGAFUNE J, CELLA M, COLONNA M, FACCHETTI F, GÜNTHER G, JOHNSTON I, LANZAVECCHIA A, NAGASAKA T, OKADA T, VERMI W, WINKELS G, YAMAMOTO T, ZYSK M, YAMAGUCHI Y, SCHMITZ J. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction". *J Exp Med* 194(12):1823-34.

FEIJÓ D, TIBÚRCIO R, AMPUERO M, BRODSKY C, TAVARES N. (2016). "Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease". *J Immunol Res* 2016:3967436.

FLOHÉ SB, BAUER C, FLOHÉ S, MOLL H. (1998). "Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*". *Eur J Immunol* 28(11):3800-11.

GALICIA G, GOMMERMAN JL. (2014). "Plasmacytoid dendritic cells and autoimmune inflammation". *Biol Chem* 395(3):335-346.

GORAK PM, ENGWERDA CR, KAYE PM. (1998). "Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12

- immediately following *Leishmania donovani* infection". *Eur J Immunol* 28(2):687-95.
- HART DJN. (1997). "Dendritic Cells: unique leucocyte populations which control the primary immune response". *Blood* 90:3245-87.
- HART DNJ, CLARK GJ, DEKKER JW, FEARNLEY DB, KATO M, HOCK BD, MCLELLAN AD, NEIL T, SORG RV, SORG U, SUMMERS KL, VUCKOVIC S. (1997). "Dendritic cell surface molecules". *Fund Clin Immunol* 439-442
- HENRI S, CURTIS J, HOCHREIN H, VREMEC D, SHORTMAN K, HANDMAN E. (2002). "Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production". *Infect Immun* 70(7):3874-80.
- HENRI S, VREMEC D, KAMATH A, WAITHMAN J, WILLIAMS S, BENOIST C, BURNHAM K, SAELAND S, HANDMAN E, SHORTMAN K. (2001). "The dendritic cell populations of mouse lymph nodes". *J Immunol* 167(2):741-8.
- JARROSSAY D, NAPOLITANI G, COLONNA M, SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells". *Eur J Immunol* 31(11):3388-93.
- KADOWAKI N, HO S, ANTONENKO S, MALEFYT RW, KASTELEIN RA, BAZAN F, LIU YJ. (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens". *J Exp Med* 194(6):863-9.
- KAUTZ-NEU K, SCHWONBERG K, FISCHER MR, SCHERMANN AI, VON STEBUT E. (2012). "Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance". *Med Microbiol Immunol* 201(4):581-592.
- KIM MK, KIM J. (2019). "Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration". *RSC Adv* 9:11230-11238.
- KUSHWAH R, HU J. (2011). "Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system". *Immunology* 133(4):409-419.
- NAGAI T. (2017). "Difference between Immature Dendritic Cells (imDCs) and Mature Dendritic Cells (mDCs) derived from Human monocytes". *J Immunol* 198(1):201-16.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2019). "Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas". Washington, D.C.: OPS.
- OUGHTON JA, KERKVLIT NI. (2005). "Immune cell phenotyping using flow cytometry". *Curr Protoc Toxicol* 18:18.8.
- PATEL VI, METCALF JP. (2016). "Identification and characterization of human dendritic cell subsets in the steady state: a review of our current knowledge". *J Investig Med* 64(4):833-847.
- POCKLEY AG, FOULDS GA, OUGHTON JA, KERKVLIT NI, MULTHOFF G. (2015). "Immune Cell Phenotyping Using Flow Cytometry". *Curr Protoc Toxicol* 2(66):18.8.1-34.
- PRINA E, ABDI SZ, LEBASTARD M, PERRET E, WINTER N, ANTOINE JC. (2004). "Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation". *J Cell Sci* 117(2):315-325.
- SCOTT P, NOVAIS FO. (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis". *Nat Rev Immunol* 16(9):581-592.
- SOONG L. (2008). "Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites". *J Immunol* 180(7):4355-4360.
- STEINMAN RM, HEMMI H. (2006). "Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity". *Curr Top Microbiol Immunol* 311:17-58.
- SWIECKI M, COLONNA M. (2015). "The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells". *Nat Rev Immunol* 15:471-485.
- TIBÚRCIO R, NUNES S, NUNES I, ROSA AMPUERO M, SILVA LB, LIMA R, MACHADO TAVARES N, BRODSKY C. (2019). "Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View". *Front Immunol* 10:227.
- TSAGOZIS P, KARAGOUNI E, DOTSIKA E. (2004). "Dendritic cells pulsed with peptides of gp63 induce differential protection against experimental cutaneous leishmaniasis". *Int J Immunopathol Pharmacol* 17(3):343-352.
- VON STEBUT E, TENZER S. (2018). "Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*". *Int J Med Microbiol* 308(1):206-214.
- VREMEC D, SHORTMAN K. (1997). "Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes". *J Immunol* 159(2):565-73.
- WILLMANN K. (2003). "Flow-cytometric immune function methodology for human peripheral blood dendritic cells". *Methods Mol Biol* 215:41-57.
- ZHOU LJ, TEDDER TF. (1995). "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily". *J Immunol* 154:3821-3835.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Proyecto Grupal CDCH-UCV. PG-09-8736-2013/1.

# Estudio molecular de resistencia al antimoniato de meglumina (Glucantime®) en aislados de *Leishmania sp.* de referencia internacional y de pacientes con Leishmaniasis cutánea localizada

Diego Pereira<sup>1</sup>

diegojpereira22@gmail.com

Noris Rodríguez<sup>1</sup>

nmrodriguez@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1520-2361>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

La resistencia de *Leishmania* al antimoniato de meglumina o Glucantime® es uno de los principales fenómenos evidenciados en los pacientes con falla terapéutica, cuyo estudio es imprescindible para el diseño de nuevas alternativas terapéuticas. En este trabajo se reportan los resultados de un estudio comparativo del perfil genético de cepas resistentes y no resistentes al Glucantime®, con el objetivo de identificar posibles marcadores genéticos relacionados con la resistencia al fármaco en los casos de leishmaniasis cutánea localizada. Para ello, se realizó inducción de resistencia *in vivo* e *in vitro* al fármaco en cepa de referencia internacional de *L. (V.) braziliensis* y se comparó con aislados provenientes de pacientes con o sin falla terapéutica. Se realizó digestión con enzimas de restricción (HindIII, PstI, MspI) y electroforesis en gel de agarosa al 1%, haciendo uso de comparación manual y estadística descriptiva para el análisis. Se evidenciaron bandas de mayor intensidad, con peso molecular entre 2,0 y 1,5 kb en uno de los aislados sin curación clínica (HindIII), y dos bandas distintivas de 0,65 kb y 0,5 kb (MspI) en el aislado con inducción de resistencia experimental. La mayoría de los pacientes informó como procedencia y sitio de probable infección al estado Miranda (57,14% y 71,42%, respectivamente), y una minoría (28,58%) tuvo falla terapéutica. Fue posible identificar variaciones en los perfiles de restricción de aislados resistentes experimentalmente inducidos y de pacientes con falla terapéutica. Adicionalmente, se propone un nuevo método para la inducción de resistencia al fármaco en condiciones *in vivo* e *in vitro*.

**Palabras Clave:** Leishmaniasis; Tratamiento; Resistencia; Marcadores moleculares; Antimoniato de Meglumina.

## MOLECULAR STUDY OF RESISTANCE TO THE ANTIMONIATE OF MEGLUMINA (GLUCANTIME®) IN ISOLATED OF *Leishmania sp.* OF INTERNATIONAL REFERENCE AND PATIENTS WITH LOCALIZED CUTANEOUS LEISHMANIASIS

### ABSTRACT

*Leishmania* resistance to meglumine antimoniate or Glucantime® is one of the main phenomena evident in patients with therapeutic failure, the study of this phenomena is essential for the design of new therapeutic alternatives.

In this work we describe an experimental study carried out in order to do a comparative analysis of the genetic profile of resistant and non-resistant strains to Glucantime®, and the identification of possible genetic markers related to drug resistance in cases of localized cutaneous leishmaniasis. To do this, induction of resistance *in vivo* and *in vitro* to the drug was performed using the therapeutic dose of glucantime with the international reference strain of *L. (V.) braziliensis* and compared with samples from patients with or without therapeutic failure. Digestion with restriction enzymes (HindIII, PstI, MspI) and 1% agarose gel electrophoresis were performed, using manual comparison and descriptive statistics for the analysis. Bands of greater intensity were evident, with a molecular weight between 2.0 and 1.5 kb in one of the patients without clinical cure (HindIII), and two distinctive bands of 0.65 kb and 0.5 kb (MspI) in the isolated with induction of resistance experimentally. The majority of the patients came from Miranda state and it is the probably site of infection (57.14% and 71.42%, respectively), and a minority (28.58%) had a therapeutic failure. It was possible to identify variations in the restriction profiles of experimentally resistant parasites and that from patients with therapeutic failure. In addition, a new method for the induction of drug resistance under *in vivo* and *in vitro* conditions was proposed.

**Keywords:** Leishmaniasis; Treatment; Resistance; Molecular Markers; Meglumine Antimoniate.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad de transmisión vectorial, causada por parásitos del género *Leishmania spp*, la cual se encuentra ampliamente extendida en todo el mundo, especialmente en regiones tropicales y en pacientes con estrato socio-económico bajo (Handler *et al.*, 2015). Desde que un conjunto de científicos (como Leishman, Donovan y Viannia) descubrieron, de forma independiente, el microorganismo causante de la enfermedad, numerosas investigaciones han sido llevadas a cabo para caracterizar a nivel básico y clínico una de las parasitosis más frecuentes en la actualidad, después de la malaria o paludismo (OMS, 2010).

Las opciones terapéuticas de la enfermedad incluyen drogas convencionales como los antimoniales pentavalentes (SbV), Anfotericina B, Miltefosina, Pentamidina y Paramomicina (De Guglielmo *et al.*, 2018). Los primeros (SbV) incluyen a su vez, el antimonio de meglumina o Glucantime® (GLU) y el Estibogluconato de sodio, los más frecuentemente usados en Latinoamérica, según los datos disponibles para el año 2008 (Tuon *et al.*, 2008), logrando la cura satisfactoria del 76,5% de los

casos. En este orden de ideas, a pesar de que el tratamiento con Pentamidina ha mostrado resultados relativamente similares; la experiencia terapéutica, el costo y los efectos adversos son factores que condicionan a los SbV como la primera opción terapéutica de la región.

Sin embargo, la resistencia adquirida al GLU (Berg *et al.*, 2013) es un fenómeno cuya frecuencia ha incrementado con el paso de los años, inicialmente en India (Lira *et al.*, 1999), lo cual obligó a las autoridades competentes a la aplicación de alternativas terapéuticas. A partir de ese momento, la resistencia a los SbV se ha reportado en otras regiones. Este fenómeno puede estudiarse a nivel fenotípico, proteómico o genómico (Jeddi *et al.*, 2011), siendo este último evaluado, entre otros métodos, mediante el análisis de longitud de fragmentos de restricción con endonucleasas, el cual permite evaluar la variabilidad genética entre aislados resistentes y sensibles al tratamiento, mediante la comparación de los patrones o perfiles de restricción obtenidos.

La falla terapéutica con los fármacos convencionales es un fenómeno multifactorial, y depende en buena medida de factores relacionados al hospedador, coinfecciones, al fármaco y al parásito (Ponte-Sucre *et al.*, 2017; Ait-Oudhia *et al.*, 2011). Dentro de este último grupo de factores, se incluye la resistencia al tratamiento (innata o adquirida), reportada inicialmente en India (Lira *et al.*, 1999) y extendida eventualmente a otras regiones del mundo mediante estudios de susceptibilidad a antimicrobianos (Serenio *et al.*, 2019). Sin embargo, los datos epidemiológicos sobre dicha problemática son escasos, por lo que la necesidad de conocer el estado actual de resistencia en los países en los que los antimoniales pentavalentes siguen siendo la primera opción terapéutica, son estrictamente necesarios.

El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis comparativo entre el perfil genético observado en cepas experimentalmente resistentes y no resistentes al GLU, además de muestras provenientes de pacientes con y sin falla terapéutica, con la finalidad de identificar posibles marcadores genéticos relacionados con la resistencia

al fármaco en casos de leishmaniasis cutánea localizada.

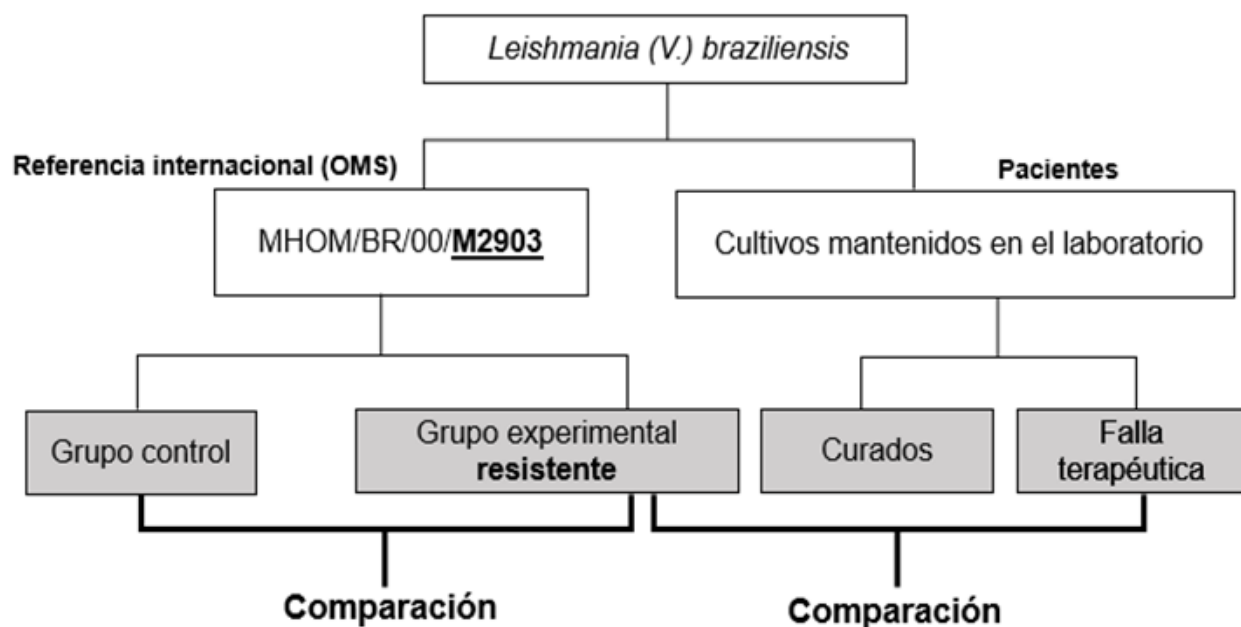
## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, cuyos aspectos metodológicos básicos para la obtención de muestras y la posterior comparación de perfiles genéticos se resumieron en el algoritmo correspondiente a la figura 1.

### Muestras y animales de experimentación

Para la inducción de resistencia *in vivo* al GLU, se utilizó la cepa de referencia internacional de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (MHOM/BR/00/M2903).

Además, se seleccionaron cultivos de parásitos previamente extraídos de pacientes que acudieron a la consulta de dermatología del IBJC. En ambos casos, los aislados se encontraban en el banco de muestras biológicas del laboratorio de ingeniería genética del IBJC.



**Figura 1.** Algoritmo metodológico para obtención de muestras y comparación de perfiles genéticos.

El proceso de selección de muestras provenientes de pacientes se realizó mediante muestreo no probabilístico por conveniencia, según disponibilidad de las mismas en el laboratorio y con base en los criterios de inclusión en el estudio. Estos últimos consistieron en poseer, según los datos disponibles en la historia clínica del paciente de origen: (a) diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea localizada, (b) tratamiento con antimoniato de meglumina (Glucantime®) intralesional a dosis terapéuticas (10-20 mg/kg/día) con duración según criterio clínico y (c) determinación de especie por métodos moleculares compatibles con infección por *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. Los criterios de exclusión incluyeron: (a) contaminación de la muestra y (b) mala

calidad del material genético extraído.

Estos se estratificaron según la respuesta al tratamiento como “curados” y “no curados”, con base en los criterios planteados por la OMS (PAHO, 2018). Adicionalmente, y con fines descriptivos, se identificaron las siguientes variables: duración del tratamiento hasta lograr la cura clínica, edad, sexo, procedencia y lugar probable de infección.

### Inducción de resistencia *in vivo* al antimoniato de meglumina

La cepa de referencia de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (MHOM/BR/00/M2903) fue inoculada en la almohadilla plantar de una de las patas traseras de ratones de la cepa BALB/c, posterior a lo cual se esperaron ocho

semanas antes de obtener una lesión significativa para comenzar el tratamiento intralesional. Dicho procedimiento consistió en pesar diariamente al animal, así como también medir el tamaño de la pata lesionada y la sana para determinar el tamaño de la lesión. Se administró una dosis diaria de antimonio de meglumina de 20 mg/kg durante 12 días. Cuando se cumplió el tratamiento, se procedió a tomar una biopsia de la lesión para la obtención de los parásitos. Los mismos se mantuvieron en medios de cultivo con la presencia de GLU, con el objetivo de mantener la presión selectiva del fármaco.

### Cultivo de parásitos

Los parásitos aislados se mantuvieron en medio líquido M199 (Difco®) suplementado con suero fetal bovino (al 10%), penicilina (10,000 U/mL), estreptomycin (10,000 µg/mL) y GLU (4 mg/mL), realizando pases sucesivos semanalmente. Después de la inducción de resistencia al fármaco, los mismos fueron cultivados masivamente y cuando el crecimiento del grupo resistente (determinado por recuento en cámara de Neubauer) bajo la presencia de GLU fue igual al de la cepa sensible (en un medio de cultivo distinto sin GLU), se procedió a la extracción de ADN total (ADNt), al quinto día de cultivo. Los parásitos considerados resistentes se denominaron “grupo experimental”, mientras que aquellos que no estuvieron expuestos al medicamento fueron denominados “grupo control”.

### Extracción de ADNt y determinación de especie por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Para la extracción y cuantificación de ADNt se realizó el mismo procedimiento realizado en otro estudio (Rodríguez *et al.*, 2002). En cuanto a la determinación de especie por PCR, por cada aislado proveniente de paciente, se realizó el procedimiento con 100 ng de ADNt en una mezcla de reacción que contuvo 200 ng del oligonucleótido B1 (5'-GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG-3') y B2 (5'-CTA ATT GTG CAC GGG GAG G-3'); 2,5 mM de deoxinucleótidos (dNTPs) y 2,5U de la enzima Taq Polimerasa. La mezcla de reacción fue sometida a 35 ciclos de amplificación (luego de 10 minutos a 90 °C para lograr la completa desnaturalización). Cada ciclo consistió en 1 minuto a 72 °C para amplificación.

Para considerar a una muestra positiva para *L. (V.) braziliensis*, se debía evidenciar el producto esperado de 750 pb.

### Digestión con enzimas de restricción

Se utilizaron las endonucleasas de restricción HindIII, PstI y MspI (Promega®, 10 U/µL), mezclando 10 µg de ADNt, 1 µL de enzima, 5 µL del buffer de la enzima (10X) y agua destilada (hasta alcanzar un volumen de 20 µL). Las mezclas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE y tinción con 5 µL de bromuro de etidio (0,5 µg/µL) para la visualización con luz ultravioleta, tomándose una fotografía de cada gel (MultiDoc-It UV Transiluminator de Analytic Jena®).

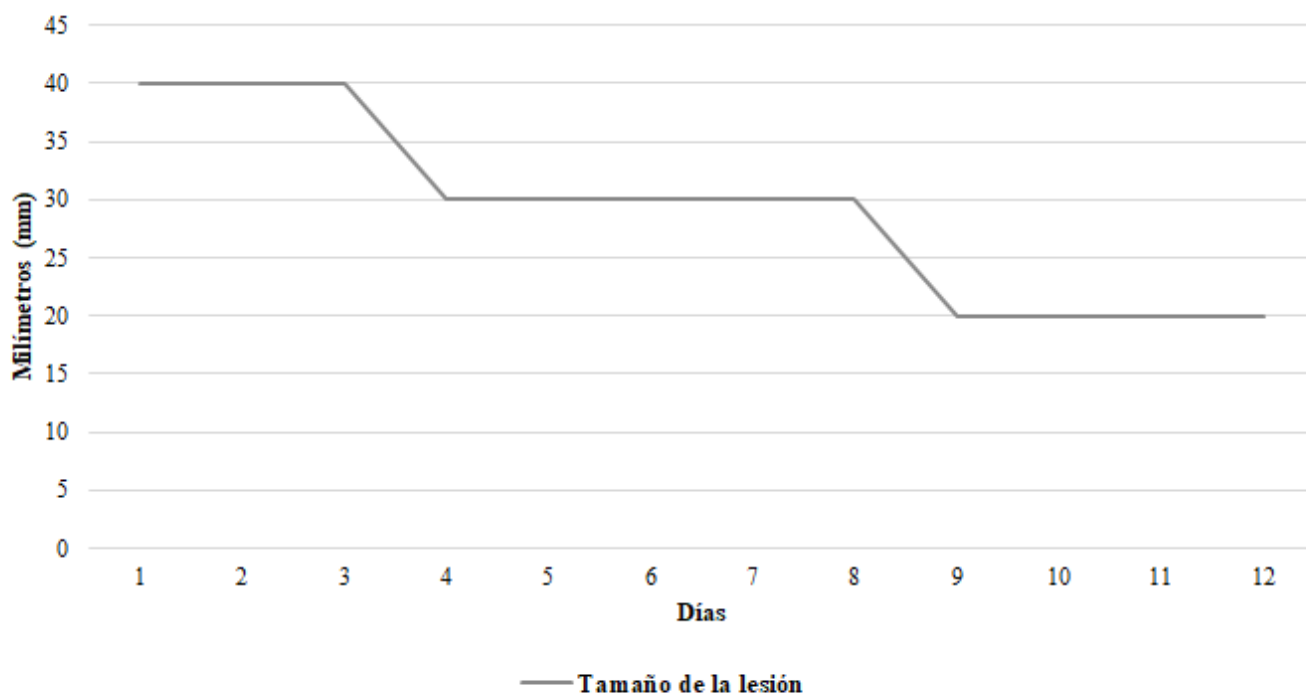
### Análisis de resultados

Para el análisis se usó estadística descriptiva. Las variables cuantitativas se expresaron con medidas de frecuencia central (media), y las cualitativas en forma de proporciones como porcentajes. El análisis comparativo de las bandas observadas se realizó de forma manual.

## RESULTADOS

Se aplicó una inyección intralesional diaria del fármaco según dosis ponderal previamente establecida, durante 12 días utilizándose 15 µL del fármaco diariamente, no se registraron cambios de peso durante dicho período. En total, se administraron 216 µL del fármaco durante los 12 días de tratamiento. En la figura 2 se observa de forma gráfica la disminución progresiva de la lesión en la almohadilla plantar trasera del ratón, determinada por la diferencia de tamaño diario entre la pata sana y la lesionada.

Se seleccionaron 7 muestras provenientes de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión en el estudio. El promedio de edad de los pacientes al momento del diagnóstico fue de 44 años, existiendo ligera tendencia hacia el sexo femenino (57,14%) frente al masculino (42,86%). En orden decreciente de frecuencia, los pacientes provinieron del estado Miranda (57,14%), Vargas (28,57%) y el Distrito Capital (14,29%). En cuanto al posible lugar de infección, predominó el estado Miranda (71,42%), seguido de los estados Vargas y



**Figura 2.** Evolución de lesión ulcerada en la almohadilla plantar trasera de ratón BALB/c previamente inoculado con *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/M2903).

Táchira, con la misma proporción cada uno (14,29%). La mayoría de los pacientes (71,42%) fueron calificados como “curados” y el resto (28,58%) como “no curados”. El promedio de duración del tratamiento fue de 4,8 y 13 meses para cada grupo, respectivamente.

Se realizó la PCR según el procedimiento antes descrito para la determinación de especie, obteniéndose el producto esperado de 750 pb, tal como se muestra en la figura 3.

Luego de la extracción de ADNt y cuantificación del material genético, se procedió a realizar las digestiones con endonucleasas de restricción, que se realizaron según el protocolo antes descrito. En la figura 4, se observa una electroforesis en gel de agarosa que muestra el material genético proveniente de las

muestras aisladas de pacientes con la enzima HindIII. Al comparar las muestras, es posible evidenciar diferencias significativas dadas por bandas de mayor intensidad correspondiente a las bandas entre 2 y 1,5 kb en la muestra 1 de paciente (P1) respecto a la muestra 3 (P3).

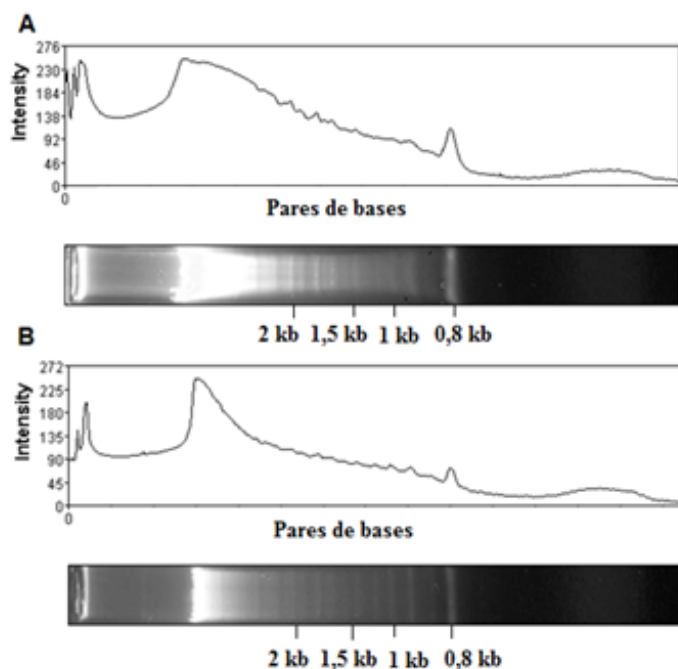
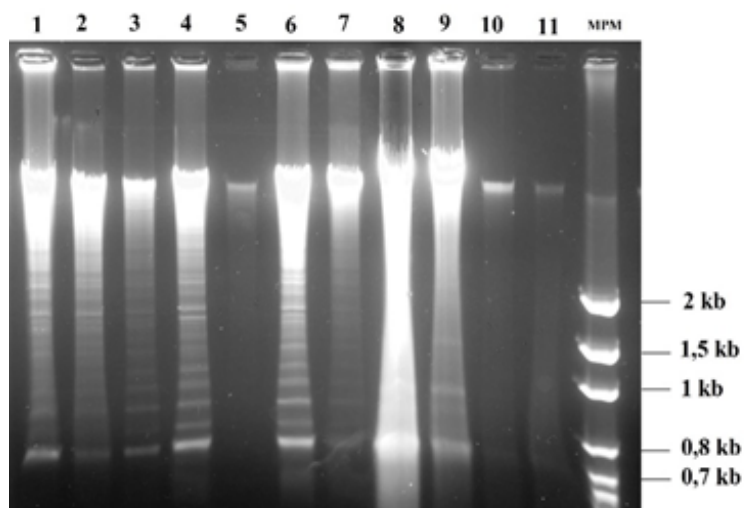
En la figura 5 se observa una comparación entre una muestra de un paciente con falla terapéutica (P1) y el del grupo control y experimental, digeridos con la enzima PstI y MspI, por separado. En el grupo control se evidencia una banda de aproximadamente 0,6 kb. En el aislado resistente se puede apreciar alrededor de los 0,65 kb, por último, una banda de casi 0,7 kb correspondiente a P1. Por lo tanto, se identificaron diferencias sutiles en cada uno de los aislados,

obteniendo un perfil de restricción distinto en cada caso.

Por último, al evaluar la digestión con *MspI*, fue posible observar en el grupo control una banda de aproximadamente 0,6 kb, a diferencia del aislado resistente en donde se observan dos bandas: una correspondiente a 0,65 kb y otra de 0,5 kb. En el caso de la muestra proveniente de P1, se observa una banda única de 0,6 kb. Por lo tanto, fue posible identificar un patrón de restricción distinto en el aislado con resistencia inducida experimentalmente y el aislado proveniente del paciente con falla terapéutica.



**Figura 3.** Productos de PCR de muestras provenientes de pacientes en electroforesis en gel de agarosa al 1% usando primers B1 y B2. 1: Control positivo / 2: Control negativo / 3-9: Pacientes (P1-P7, respectivamente) / MPM: Marcador de peso molecular.

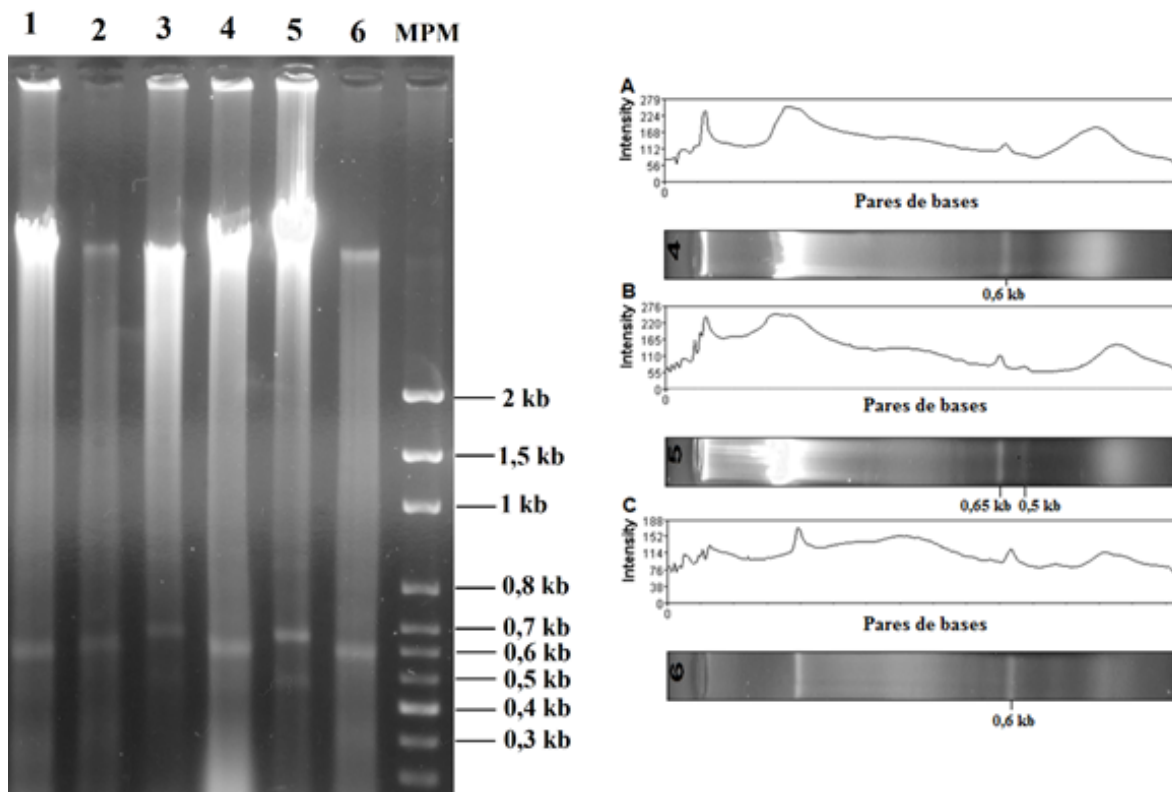


**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra digestión de ADN total con enzima *HindIII*. *Imagen izquierda:* L1-7: Muestras provenientes de pacientes / L8: Muestra no digerida / L9: Grupo control / L10-11: Muestra no digerida / MPM: Marcador de peso molecular 100pb Axygen®. *Imagen derecha:* A: Paciente 1 (P1) / B: Paciente 3 (P3).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se reportaron variaciones genéticas evidentes mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción en el ADNt de aislados de *Leishmania (V.) braziliensis*, al comparar los patrones de restricción del ADNt de los parásitos

aislados de pacientes (con y sin curación clínica), respecto a los aislados provenientes de cepas de referencia internacional (MHOM/BR/00/M2903) cuya resistencia fue inducida experimentalmente mediante inyecciones intra-lesionales en animales de experimentación y, posteriormente, con la presión selectiva del fármaco en medios de cultivo. En general, las bandas identificadas fueron de bajo peso molecular.



**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra digestión de ADN sensible, resistente y de paciente con enzimas PstI y MspI en 24h.  
 Imagen izquierda: L1: Grupo control + PstI / L2: Grupo experimental + PstI / L3: P1 + PstI / L4: Grupo control + MspI / L5: Grupo experimental + MspI / L6: P1 + MspI / MPM: Marcador de peso molecular 100 pb Axygen®. Imagen derecha: A: Grupo control + MspI / B: Grupo experimental + MspI / C: Paciente 1 (P1) + MspI.

La diferencia entre los perfiles de restricción (con PstI o MspI) en los aislados de referencia (sensibles y resistentes) y el proveniente del paciente con falla terapéutica, apoya las hipótesis y conclusiones realizadas en estudios previos (Jeddi *et al.*, 2011) (Adaui *et al.*, 2011) que afirman el hecho de que aislados con resistencia *in vitro*, no necesariamente tienen la misma expresión genética que aquellos provenientes de pacientes sin curación clínica (es decir, con aparente resistencia). La expresión diferencial de ciertos genes implicados en el metabolismo de los antimoniales pentavalentes entre distintos aislados de *L. (V.) braziliensis*, hizo sugerir a Adaui y colaboradores en el 2011 (Adaui *et al.*, 2011) una posible respuesta pleiotrópica del parásito ante la presión selectiva del fármaco, un hecho anteriormente evidenciado en *L. donovani*. Esto sugiere que, experimentalmente, es posible obtener respuestas diferentes durante la exposición al

fármaco y con la misma especie, aun en condiciones controladas. Además, el hecho de que en este trabajo se haya encontrado un perfil ligeramente distinto en el paciente sin cura clínica sugiere pensar en la influencia de la localización geográfica y las características específicas del hospedero sobre el parásito, teniendo en cuenta plasticidad genética de *Leishmania* como género (Laffitte *et al.*, 2016), provocando cambios epigenéticos (Rodríguez *et al.*, 2002) que los diferencien, desde el punto de vista molecular, de aquellos manipulados experimentalmente.

Además, las diferencias observadas al comparar a los pacientes sin curación clínica (P1 y P3), en los que se evidenciaron ligeras diferencias, pueden explicarse por varias razones. La primera de ellas es que, en el supuesto caso de que ambos aislados fuesen resistentes, se ha reportado una gran diversidad genética (Gómez *et al.*, 2013) inclusive entre parásitos de la misma especie, lo cual explicaría las diferencias

observadas como consecuencia del genoma original del parásito. Por otro lado, suponiendo que no hubiese variabilidad genética implicada, y que efectivamente ambos fuesen resistentes, las modificaciones genéticas dadas por la presión selectiva de la droga no siempre es igual, teniendo en cuenta los distintos factores que pueden provocar cambios epigenéticos en *Leishmania* (Afrin *et al.*, 2019) en un mismo momento, los cuales suelen estar relacionados al hospedador. A pesar de ello, la identificación de estos factores no fue el objetivo en este estudio, aunque constituye un tópico de vital importancia para nuevas investigaciones.

En el caso específico de *L. (V.) braziliensis*, la identificación de variantes genéticas (sin tomar en cuenta la resistencia al tratamiento) ha sido reportada previamente en la literatura. En Venezuela, se detectaron tres grupos de parásitos según cambios moleculares evidenciados mediante digestión con enzimas de restricción e hibridación *in situ* con la sonda LbJ38 (Rodríguez *et al.*, 1997). Estos cambios se relacionaron con la heterogeneidad de las bandas observadas, cada una con peso molecular entre 0,5 y 1,6 kb (Rodríguez *et al.*, 1998). Es por eso que, en el presente trabajo, las diferencias entre los aislados de pacientes con falla terapéutica podrían explicarse por otros factores inherentes a la variabilidad genética propia del parásito, más allá de la probable relación con la resistencia a los antimoniales pentavalentes. La diferencia de vectores y reservorios, los aspectos geográficos y ecológicos son factores que influyen a nivel mundial en la diversidad molecular del parásito, independientemente de la exposición a un fármaco (Rodríguez *et al.*, 1998).

La distribución geográfica de los pacientes en este estudio se relaciona directamente con la cercanía del IBJC (localizado en el Distrito Capital). Sin embargo, por lo menos en relación al estado Miranda, este fue reportado como el tercero con mayor número de casos de la enfermedad en el último estudio de epidemiología molecular en el año 2001 (Rodríguez *et al.*, 1997), siendo superado solo por Lara y Mérida. En esta oportunidad, la mayoría de los aislados correspondieron a *L. (V.) braziliensis* (62,12%), seguido de *L. (L.) mexicana* (9,09%), siendo el resto de los

resultados (28,79%) negativos. Puede que esta tendencia se siga manteniendo en la actualidad, aunque son necesarios nuevos estudios epidemiológicos en el área para corroborarlo.

Fue posible comprobar que la manipulación experimental realizada en este trabajo, con la que se propone una nueva metodología para la inducción de resistencia *in vivo* (en vez de la clásica inducción *in vitro*) es capaz de inducir cambios moleculares evidentes, y que el hecho de que se observara un perfil ligeramente distinto en los aislados provenientes de pacientes con falla terapéutica, corrobora el hecho de que se trata de un fenómeno multifactorial en el que la resistencia al tratamiento no es la única posibilidad a considerar.

La identificación de marcadores genéticos de resistencia es importante para identificar nuevos blancos terapéuticos, y, por consiguiente, para el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento. Sin embargo, para que los resultados observados en estudios de resistencia sean aplicables al contexto clínico, es necesario el desarrollo de herramientas que cumplan con una serie de condiciones (Serenio *et al.*, 2019): (a) fácil de estandarizar, (b) ser económico, (c) fácil de manejar o realizar y (d) fácil de interpretar. Es por ello que el estudio constante de las alteraciones genéticas debe profundizarse, con el objetivo de permitir una diferencia significativa en el manejo clínico de los pacientes.

## CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados inicialmente, se detectaron perfiles de restricción distintos al comparar un aislado proveniente de paciente con falla terapéutica respecto a aislados de *L. (V.) braziliensis* de referencia internacional sensibles y resistentes al antimonio de meglumina, además de encontrarse diferencias significativas al comparar los aislados provenientes de pacientes sin curación clínica entre sí. Sin embargo, el tamaño de la muestra es pequeño y hace falta continuar este estudio incluyendo un mayor número, a fin de obtener resultados más concluyentes. Además, se logró formular una nueva metodología para la inducción de resistencia en los parásitos, lo cual puede ser de gran

utilidad para la obtención de marcadores genéticos de resistencia al Glucantime®, que puedan ser útiles para la indicación del tratamiento a seguir en el caso de la leishmaniasis cutánea localizada.

## REFERENCIAS

- ADAUI V, SCHNORBUSCH K, ZIMIC M, GUTIÉRREZ A, DECUYPERE S, VANAERSCHOT M, et al. (2011). "Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony". *Parasitology* 138:183-93.
- AFRIN F, KHAN I, HEMEG HA. (2019). "Leishmania-Host Interactions—An Epigenetic Paradigm". *Front Immunol* 10:492.
- AÏT-OU DHIA K, GAZANION E, VERGNES B, OURY B, SERENO D. (2011). "Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field". *Parasitol Res* 109:1225-32.
- BERG M, MANNAERT A, VANAERSCHOT M, VAN DER AUWERA G, DUJARDIN JC. (2013). "(Post-) Genomic approaches to tackle drug resistance in *Leishmania*". *Parasitology* 140(1):1492-505.
- DE GUGLIELMO Z, RODRÍGUEZ N, OVIEDO H. (2018). "Tratamientos para la leishmaniasis". *Rev Fac Med* 41(1):4-26.
- GOMEZ A, NARA E. (2013). "Análisis de la diversidad genética de *Leishmania infantum* en Paraguay mediante la técnica del KDNA-PCR-RFLP". [Internet]. Disponible en: <https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-014.pdf>.
- HANDLER MZ, PATEL PA, KAPILA R, AL-QUBATI Y, SCHWARTZ RA. (2015). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis". *J Am Acad Dermatol* 73(1):897-908.
- JEDDI F, PIARROUX R, MARY C. (2011). "Antimony Resistance in *Leishmania*, Focusing on Experimental Research". *J Trop Med* 2011:1-15.
- LAFFITTE M-CN, LEPROHON P, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M. (2016). "Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance". *F1000Res* 5(1):2350.
- LIRA R, SUNDAR S, MAKHARIA A, KENNEY R, GAM A, SARAIVA E, et al. (1999). "Evidence that the High Incidence of Treatment Failures in Indian Kala-Azar Is Due to the Emergence of Antimony-Resistant Strains of *Leishmania donovani*". *JID* 180(1):564-7.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2010). "Control de la leishmaniasis: serie de informes técnicos". [Internet]. Disponible en: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis).
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (2018). *Leishmaniasis in the Americas: Treatment recommendations*. [Internet]. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22226&Itemid](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&Itemid).
- PONTE-SUCRE A, GAMARRO F, DUJARDIN J-C, BARRETT MP, LÓPEZ-VÉLEZ R, GARCÍA-HERNÁNDEZ R, et al. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11(12):e0006052.
- RODRÍGUEZ N, CARDONA M, ZERPA O, BARRIOS M, SOSA A, FERNÁNDEZ A. (2001). Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania* spp en áreas endémicas de Venezuela. *Bol Malarial y Sal Amb* 41(1,2):21-26.
- RODRIGUEZ N, DE LIMA H, AGUILAR CM, RODRIGUEZ A, BARKER DC, CONVIT J. (2002). Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *T Roy Soc Trop Med H* 96(1):105-9.
- RODRÍGUEZ N, DE LIMA H, BARRIOS M, DE GUGLIELMO Z, RODRÍGUEZ A, CARDONA M, et al. (1998). Genetic variability within *L.(V.) braziliensis* (Venezuelan strains) isolated from patients with cutaneous Leishmaniasis. En XI ICOPA Congress Japón.
- RODRIGUEZ N, DE LIMA H, RODRIGUEZ A, BREWSTER S, BARKER DC. (1997). Genomic DNA repeat from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitology* 115:349-58.
- SERENO D, HARRAT Z, EDDAIKRA N. (2019). Meta-analysis and discussion on challenges to translate *Leishmania* drug resistance phenotyping into the clinic. *Acta Tropica* 191(1):204-11.
- TUON F, AMATO V, GRAF M, MACHADO A, NICODEMO A, NETO V. (2008). Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol* 47(1):109-24.

## AGRADECIMIENTOS

A Zoraya De Guglielmo, Rosmary Pacheco y Henry Oviedo, personal del laboratorio de ingeniería genética del IBJC por la asesoría y colaboración técnica y logística.

# Estudio preliminar del efecto *in vitro* del extracto de hojas de *Artemisia annua* en el crecimiento de *Leishmania braziliensis*

Zoraya De Guglielmo<sup>1</sup>

zdegugli@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-2395-9025>

Henry Oviedo<sup>1</sup>

henryovied@gmail.com

Miguel Rojas<sup>1</sup>

migarojm@yahoo.es

Noris Rodríguez<sup>1</sup>

nmrodriguez@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

El tratamiento de primera línea contra la Leishmaniasis consiste en la administración de antimoniales pentavalentes, los cuales producen efectos secundarios indeseados e incluso, altamente nocivos. Además, son varios los reportes de generación de resistencia a estas drogas por parte del parásito, lo que ha llevado a la evaluación de terapias alternativas dentro de las que destaca el uso de plantas y/o sus principios activos. En el presente trabajo se reportan los resultados preliminares sobre el efecto del extracto de *Artemisia annua* L. en las especies *L. (V) braziliensis* y *L. (L) mexicana* prevalentes en Venezuela, así como en parásitos *L. (V) braziliensis* resistentes al Glucantime. Los parásitos fueron cultivados en medio bifásico agar base sangre. Se probaron varias concentraciones del extracto vegetal, entre 10 y 30 mg, procesado en agua destilada estéril mediante sonicación y esterilizado en autoclave. Se observó la reducción del número de parásitos aún con la concentración más baja, respecto a lo registrado en los controles. También se observó efecto antileishmania en los parásitos resistentes al Glucantime. Estos resultados señalan la utilidad potencial de esta planta en el tratamiento de la Leishmaniasis asociada a *L. (V) braziliensis* y *L. (L) mexicana* e incluso, en casos resistentes al Glucantime. A futuro, es importante realizar pruebas con un rango más amplio de concentraciones del compuesto, tanto *in vitro* como en modelos murinos.

**Palabras Clave:** Leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; *Artemisia annua*; efecto parasiticida.

## PRELIMINARY STUDY OF THE *In Vitro* EFFECT OF THE *Artemisia annua* LEAVES EXTRACT ON THE GROWTH OF *Leishmania braziliensis*

### ABSTRACT

The first-line treatment against Leishmaniasis consists in the administration of pentavalent antimonial, which produce unwanted and even highly harmful side effects. On the other hand, there are several reports of the generation of resistance to these drugs by the parasite, which has led to the evaluation of

alternative therapies, highlighting the use of plants and / or their active ingredients. Here we report the results of a preliminary study on the effect of the extract of *Artemisia annua* L. in *L. (V) braziliensis* and *L. (L) mexicana*, prevalent species in Venezuela, as well as in parasites of *L. (V) braziliensis* Glucantime-resistant. The parasites were grown in biphasic blood-based agar medium. Several concentrations of the plant extract, between 10 and 30 mg, were tested, processed in sterile distilled water by sonication and sterilized by autoclave. We observed the reduction in the number of parasites even with the lowest concentration, compared to that recorded in the controls. Anti-Leishmania effect was also observed in Glucantime resistant parasites. These results indicate the potential utility of this plant in the treatment of Leishmaniasis associated with *L. (V) braziliensis* and *L. (L) mexicana* and, even, in cases resistant to Glucantime. In the future, it is important to perform tests with a wider range of concentrations of the compound, both *in vitro* and in murine models.

**Keywords:** Leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; *Artemisia annua*; parasitological effect.

## INTRODUCCIÓN

El género *Leishmania* agrupa 21 especies conocidas de parásitos intracelulares dimórficos, patogénicas al hombre, responsables de la Leishmaniasis, parasitosis endémica en grandes áreas tropicales, subtropicales y en la cuenca del Mediterráneo, con manifestaciones clínicas diversas que incluyen la Leishmaniasis Cutánea, la Leishmaniasis Mucosa y la Leishmaniasis Visceral (Akhoundi *et al.*, 2017).

En las Américas, entre 2001 y 2017, un total de 940.396 nuevos casos de Leishmaniasis Cutánea y Mucosa fueron reportados por 17 de los 18 países endémicos, con un promedio anual de 55.317 casos (OPS, 2019). Según De Lima *et al.* (2010, 2011), en Venezuela la Leishmaniasis Cutánea abarca todo el territorio nacional con el 97,93% de los casos de Leishmaniasis reportados entre 1998 y 2009, registrándose un número total de 52.282 casos y una tasa de incidencia que disminuye progresivamente a partir del año 2003 de 11,8 x 100.000 habitantes a 7,94 x 100.000 habitantes en 2009; los autores destacan la existencia de un subregistro notable de los casos. La especie identificada con mayor frecuencia es *L. (V) braziliensis*, relacionada con la Leishmaniasis Cutánea, seguida por *L. (L) amazonensis* y *L. (L) mexicana*, con una frecuencia muy baja, relacionadas generalmente a la forma difusa de la enfermedad que representa el 0,06% de todos los casos de Leishmaniasis en Venezuela (Zerpa y Convit, 2009).

Debido a que existen varias manifestaciones clínicas de la parasitosis relacionadas a distintas especies del parásito, con un amplio espectro de sensibilidad a los

fármacos disponibles, se han desarrollado diversos tratamientos que incluyen terapias físicas, vacunas, compuestos naturales y quimioterapia con drogas convencionales de las cuales las más utilizadas mundialmente son los antimoniales pentavalentes. Las principales limitaciones de estas drogas son su toxicidad para el paciente y el eventual desarrollo de resistencia por parte de parásito (Layegh *et al.*, 2009, Peláez, 2012).

Dentro de los compuestos naturales para el tratamiento de la Leishmaniasis se ha probado la artemisina o artemisinina, extraída de *Artemisia vulgaris* y *Artemisia annua*, la cual ha sido efectiva en estudios *in vitro* donde se aplicaron concentraciones micro molares contra promastigotes y amastigotes de *L. donovani* infectando macrófagos de ratón, destacando que no hubo efecto en la viabilidad de los macrófagos. La ausencia de efectos citotóxicos también se observó en estudios con la línea celular humana U937 y la Raw 264.7 de ratón. Igualmente, se ha reportado la reducción de lesiones plantares en ratones BALB/C infectados con *L. major*, asociada a la disminución de la carga parasitaria. Otros compuestos aislados de *Artemisia sp.* evaluados para tratar la Leishmaniasis son el “artemether” (arteméter) y el artesunato, de los cuales solo el primero tuvo efecto leishmanicida, aunque con menor potencia que la artemisina (Avery *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1993; Islamuddin *et al.*, 2014; Mesa *et al.*, 2017).

Así mismo, se ha evaluado el efecto del polvo de la hoja de esta planta en modelos *in vitro* e *in vivo*, observándose la reducción de la carga parasitaria y del tamaño de lesiones cutáneas no complicadas asociadas a *L. (V) panamensis* (Mesa *et al.*, 2017).

Los estudios con esta planta para el tratamiento de la Leishmaniasis son prometedores y en general se han realizado con las especies *L. major* y *L. donovani* del Viejo Mundo y con *L. (V) panamensis* del Nuevo Mundo. En Venezuela, la especie prevalente es *L. (V) braziliensis* y, tomando en cuenta las variaciones de susceptibilidad ante distintos enfoques terapéuticos por parte de las distintas especies del parásito, es importante estudiar la acción de esta planta sobre la mencionada especie.

En este sentido, el presente trabajo tuvo como

objetivo la evaluación del efecto del extracto de la hoja de *Artemisia annua* L. en el crecimiento *in vitro* de promastigotes *L. (V) braziliensis* y *L. (L) mexicana*, especies prevalentes a nivel nacional. Considerando que los antimoniales pentavalentes Glucantime® y Pentostam® son los medicamentos de primera línea usados mundialmente en el tratamiento anti-*Leishmania*, se comparó el efecto del extracto vegetal con el del Glucantime®.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Parásitos.** Se utilizaron dos cepas de *Leishmania* spp.: *L. (V) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. (L) mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21).

**Medios de cultivo.** Los promastigotes de las cepas del parásito fueron cultivados en medio bifásico Base de Agar Sangre (GIBCO) y medio líquido.

- Base de Agar Sangre: se preparó al 4% en agua destilada y se esterilizó en autoclave, 20 minutos a 121 °C y 15 lb de presión. Se dejó enfriar a 50°C-60°C y se añadió sangre desfibrinada de conejo a la concentración del 10%, con 1000 U de penicilina por cada mL de sangre. El medio se distribuyó en tubos tapa rosca y placas de Petri estériles.

- Medio líquido: para un litro, se mezclaron 10 gr de glucosa y 8,5 gr de NaCl, esterilizando por autoclave. Material vegetal. Se utilizó el polvo de hojas de *Artemisia annua* L. empaquetado en cápsulas de gelatina. Este material fue donado por el PECET de la Universidad de Antioquia, Colombia, y fue obtenido como se indica en Mesa *et al.* (2017).

El polvo fue disuelto en agua bidestilada estéril, a razón de 150 mg/mL, procesado en sonicador (Branson Sonifier 250) aplicando pulsos de 100 watt durante media hora en hielo, para obtener partículas más finas del polvo y lograr una mejor disolución en el agua. Luego, se esterilizó por autoclave y se centrifugó 10 min a 12.000 rpm para separar líquidos y sólidos. Estérilmente, se tomó la parte líquida para hacer las pruebas con los parásitos.

**Efecto de *Artemisia annua* L. sobre el crecimiento *in vitro* de los parásitos.** Para evaluar el efecto del extracto vegetal en el crecimiento *in vitro* de las cepas de *Leishmania*, se colocó un millón de parásitos (promastigotes) en placas de Petri con base de agar

sangre más 2 mL de medio líquido. Se probaron 4 concentraciones del extracto vegetal: 10, 15, 20 y 30 mg, evaluando su efecto en el crecimiento, para lo cual se contó el número de parásitos vivos a las 72 horas después de iniciado el ensayo (al comienzo de la fase exponencial de crecimiento), utilizando coloración con azul tripano en cámara de Neubauer. Igualmente, se realizaron controles de parásitos creciendo en ausencia del extracto. Cada prueba con los controles y con las distintas concentraciones del extracto para las dos cepas de parásitos, se realizó por triplicado.

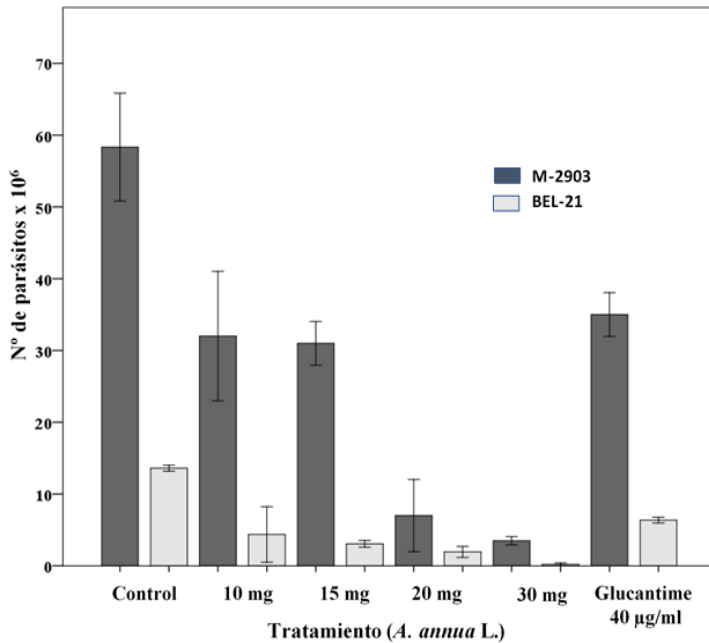
**Efecto del Glucantime sobre el crecimiento *in vitro* de los parásitos.** El crecimiento de los parásitos en presencia del extracto vegetal se comparó con el crecimiento observado en presencia del Glucantime®, fármaco de referencia en el tratamiento de la Leishmaniasis. Para ello, se colocaron  $1 \times 10^6$  parásitos en placas de Petri con el medio de cultivo bifásico, incorporando 40 µg/mL de la droga (Sanofi-Aventis), correspondiente a la dosis terapéutica reportada por distintos investigadores. Se determinó el número de parásitos en cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripano, a las 72 horas de iniciar el ensayo, el cual se realizó por triplicado.

**Efecto de *Artemisia annua* L. sobre el crecimiento *in vitro* de parásitos resistentes al Glucantime.** La resistencia al Glucantime® se obtuvo gradualmente, agregando concentraciones crecientes del fármaco a promastigotes de *L. (V) braziliensis* en cultivo durante los repiques semanales. La dosis se duplicó cada dos semanas, iniciando con 10 µg de Glucantime® por cada mL del medio de cultivo, hasta alcanzar la concentración de 3,9 mg/mL, correspondiente a 200 veces la dosis terapéutica, aproximadamente. Estos parásitos se cultivaron en presencia de la dosis mencionada de Glucantime y de 10, 20 y 30 mg del extracto de *Artemisia annua* L., tal como se indica en la prueba del efecto del compuesto vegetal en el crecimiento *in vitro* de *Leishmania* sensible al fármaco. Se realizó un control con parásitos creciendo solo en presencia del antimonial y otro control con parásitos creciendo en presencia de 7,5 µg/mL de Anfotericina B, otro compuesto usado para el tratamiento de la Leishmaniasis. El ensayo se realizó por triplicado.

## RESULTADOS

### Efecto de *Artemisia annua* L. sobre el crecimiento de los parásitos

Una vez contados los parásitos, se calculó el promedio del número de células obtenido en las tres réplicas realizadas. Estos datos se reportaron en la figura 1.



**Figura 1.** Crecimiento de los parásitos en presencia del extracto de *Artemisia annua* L. y de Glucantime. Los parásitos fueron contados 72h después de iniciar el ensayo.

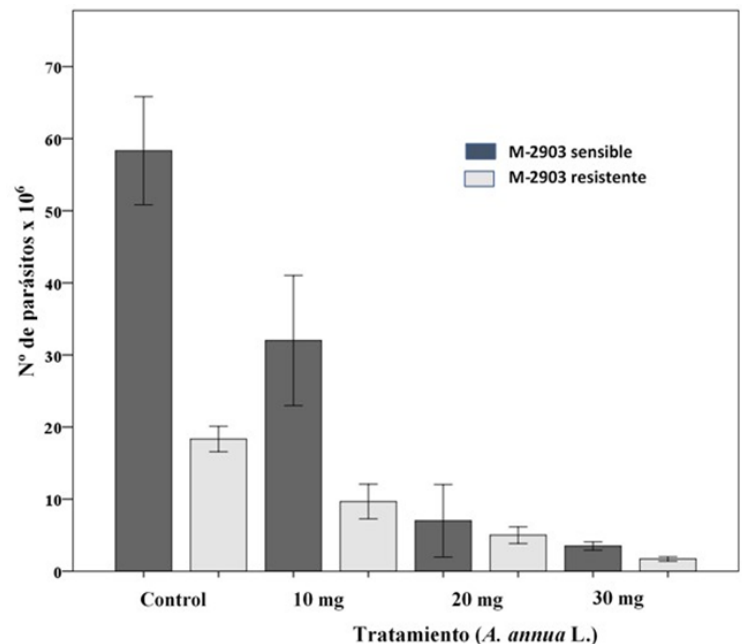
Como se observa en esta figura, el extracto vegetal tuvo un efecto dependiente de la concentración sobre el crecimiento de los parásitos. La comparación entre el número de células en los cultivos recibiendo tratamiento y el de los controles pone en evidencia una acción inhibitoria al aplicar la concentración más baja del extracto (10 mg), con aproximadamente la mitad de parásitos respecto a los reportados en los controles. La concentración más alta (30 mg) ocasionó la reducción de aproximadamente 90% en el crecimiento de los parásitos para la cepa M2903 con respecto al crecimiento observado en los controles, mientras que para la cepa BEL 21 esta concentración produjo la muerte del 70% de los parásitos sembrados inicialmente, lo que parece indicar una mayor sensibilidad frente al extracto vegetal para esta cepa respecto a la cepa M2903.

### Efecto de *Artemisia annua* L. sobre el crecimiento *in vitro* de promastigotes de M2903 resistentes al Glucantime.

Para probar el efecto de *A. annua* L. sobre parásitos resistentes al Glucantime, promastigotes de M2903 resistentes a este fármaco se cultivaron en presencia de 10, 20 y 30 mg del extracto vegetal. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 1 y la figura 2, observándose que dicho extracto, a la concentración más baja probada, redujo en aproximadamente un 50% la población de parásitos con respecto al control (cultivo en ausencia del extracto).

**Tabla 1.** Efecto de *Artemisia annua* L. sobre el crecimiento *in vitro* de promastigotes de M2903 resistentes al Glucantime

Tratamiento	Sin tratamiento (sin <i>A. annua</i> )	Anfotericina B 7,5 µg/ml	<i>A. annua</i> L.		
			10 mg	20 mg	30 mg
Nº de parásitos x 10 <sup>6</sup>					
	18,3	1,3	9,7	5	1,7



**Figura 2.** Comparación del efecto de *A. annua* en el crecimiento de M2903 sensible y resistente al Glucantime. Los parásitos fueron contados 72h después de iniciar el ensayo.

El efecto inhibitorio es dependiente de la concentración, observándose que a la más alta prácticamente no hubo crecimiento y que el número

de parásitos fue similar al obtenido con Anfotericina B. Este resultado es interesante debido a los reportes de pérdida de sensibilidad a antimoniales durante el tratamiento de pacientes con Leishmaniasis, ya que sugiere que la artemisa es una opción para terapia en esta situación, con menos costos y efectos nocivos que otras drogas comerciales como la Anfotericina.

## DISCUSIÓN

Desde hace más de 5 décadas los antimoniales pentavalentes bajo los nombres comerciales Glucantime® y Pentostam®, son los medicamentos de primera línea usados en el tratamiento de distintas manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis. Químicamente son similares y su toxicidad y eficacia están relacionadas con el contenido de antimonio Sb<sup>5+</sup>: la solución de antimoniato de meglumina contiene un 8,1% (81 mg/mL), mientras que la solución de estibogluconato de sodio contiene un 10% (100 mg/mL). En la literatura se reportan dosis entre 20 y 120 mg/kg de peso, generalmente durante 20 días, para el tratamiento de las distintas manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis (Henaó *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha reportado la aparición de resistencia por parte del parásito, además de que causa efectos adversos que incluyen anorexia, vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar, mialgias, artralgias, cefaleas, sabor metálico y letargo; esto ha llevado a la búsqueda de tratamientos alternativos y nuevas drogas menos dañinas al paciente para tratar la enfermedad. Una de estas alternativas consiste en el uso de la planta *Artemisia annua* L. o sus derivados y principios activos purificados, la cual, inicialmente, se ha usado con éxito para tratar el paludismo, incluso resistente a la cloroquina, y luego en estudios de Leishmaniasis con las especies *L. major*, *L. donovani* y *L. (V) panamensis*, incluyendo modelos murinos, pacientes y cultivo *in vitro* de promastigotes y de amastigotes en macrófagos de ratón y líneas celulares humanas. En estos estudios se ha destacado una alta efectividad y la ausencia de efectos secundarios en los animales experimentales, en los macrófagos y en las personas. Hasta ahora, se han identificado dos compuestos presentes en *Artemisia sp.* con actividad leishmanicida, la artemisinina y el arteméter, siendo el primero más

efectivo que el segundo (Avery *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 1993, Mesa *et al.*, 2017). En cuanto al mecanismo de acción de este compuesto en kinetoplastidas, particularmente en *Tripanosoma cruzi* y *Tripanosoma brucei rhodesiense*, la artemisinina inhibió el crecimiento *in vitro* y la actividad ATPasa calcio-dependiente de las membranas de los parásitos, lo que sugiere un efecto vía bombas de membrana (Mishina *et al.*, 2017). En amastigotes intracelulares de *L. donovani*, el efecto inhibitorio de aceites esenciales de *A. annua* se relacionó con el mecanismo de muerte celular programada (Islamuddin *et al.*, 2014). Unido al efecto leishmanicida, se ha observado que *A. annua* estimula la respuesta inmune Th1 (Islamuddin *et al.*, 2015).

Para este estudio preliminar sobre el efecto de *A. annua* L. en especies de *Leishmania* prevalentes en Venezuela, se usó el extracto vegetal completo obtenido de la maceración en agua destilada estéril del polvo de las hojas de la planta. En otros trabajos, este polvo ha sido disuelto en presencia de compuestos orgánicos, especialmente DMSO (con reportes controversiales de su toxicidad y efectos adversos en el organismo, incluyendo alergias), y se han probado fracciones del procesamiento con distintos alcoholes. Para este trabajo, el polvo de las hojas de *A. annua* se disolvió solo en agua, líquido vital inocuo, sin efectos adversos, lo que sería ventajoso en el uso de este vegetal como terapia contra la Leishmaniasis, reduciendo costos de procesamiento y riesgos a la salud. En cuanto al uso del polvo completo de hojas en lugar de fracciones o del principio activo purificado, distintos autores han resaltado las ventajas de este tipo de material. Se ha observado que el extracto completo contiene compuestos, especialmente flavonoides, con un efecto más sinérgico que cuando se aplica el fármaco derivado puro, destacando la inhibición del citocromo P450 humano implicado en el metabolismo de compuestos exógenos, con lo que se incrementa la vida media sérica del material administrado; la combinación de compuestos en el extracto pudiera, de esta manera, influir en un menor riesgo de desarrollo de resistencia en el parásito (Rodeiro *et al.*

2009). También se ha demostrado en estudios con terapia oral en modelos murinos, que la artemisinina del polvo administrado en cápsulas pasa rápidamente del sistema digestivo al torrente sanguíneo. Resultados similares fueron obtenidos en estudios con pacientes de paludismo a los que se les administró té de *A. annua* para tratar esta enfermedad (Rath *et al.*, 2004; Weathers *et al.*, 2011).

El extracto vegetal se ensayó en el crecimiento *in vitro* de promastigotes de *L. (V) braziliensis* y *L. (L) mexicana*, especies prevalentes en las distintas regiones endémicas de Venezuela, resaltando que en general distintos investigadores han realizado estudios con las especies *L. major* y *L. donovani* del Viejo Mundo y con *L. (V) panamensis* del Nuevo Mundo. Se probaron varias concentraciones del extracto. Se observó que la concentración más baja redujo en más del 30 % el número de promastigotes para las cepas en estudio, mientras que la más alta causó una reducción entre 90 y 100 %. Esto pone en evidencia un efecto inhibitorio de *A. annua* sobre el crecimiento y multiplicación *in vitro* de los promastigotes de estas especies, concordando con los resultados de otros investigadores en otras especies de *Leishmania spp.*

Otra prueba realizada en este estudio consistió en la obtención de promastigotes de M2903 resistentes al Glucantime para evaluar el efecto del extracto vegetal en su crecimiento. Tal resistencia se obtuvo incrementando gradualmente durante los repiques, la concentración de la droga. A este respecto, distintos investigadores han demostrado la susceptibilidad *in vitro* de promastigotes de *Leishmania spp.* a antimoniales y que dicha sensibilidad es menor a la reportada para amastigotes dentro de macrófagos en el caso del Glucantime, pero similar en el caso del Pentostam (Berman *et al.*, 1989). Tal acción inhibitoria del Glucantime se ve afectada por la composición del medio de cultivo, reportándose en medios complejos no suplementados, mientras que en medios suplementados y muy ricos en nutrientes tiende a observarse resistencia a la droga por parte de los promastigotes; esto pudiera explicar la existencia de resultados controversiales en cuando a la sensibilidad de promastigotes al Glucantime (Moreira *et al.*, 1995). Por su parte, Moreira y Petrillo-Peixoto (1991),

evaluando el efecto del Glucantime en el crecimiento *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* en Suramérica, reportan diferencia de susceptibilidad entre distintas cepas, observando en las más sensibles naturalmente (*L. (V) braziliensis* M2903 y *L. (V) guyanensis* M1176) la inhibición dosis-dependiente del crecimiento, en un rango de 0,23 a 23 mM; las cepas naturalmente resistentes (*L. (L) amazonensis* M10996 y *L. (V) braziliensis* LTB259), fueron inhibidas a concentraciones mucho más altas del antimonial (entre 20 mM- 70 mM). Similarmente a este estudio, Grogl *et al.* (1989) desarrollaron resistencia al Glucantime en promastigotes naturalmente sensibles, exponiéndolos gradualmente a concentraciones crecientes de la droga. Señalan la inestabilidad de esta resistencia en parásitos con pocos pases en presencia de la droga (tres o menos) y la observación de estabilidad después del tercer repique; en consecuencia, hacen énfasis en el riesgo de emergencia de resistencia a antimoniales en *Leishmania* debido a la aplicación de dosis inadecuadas de la droga durante el tratamiento de la parasitosis.

En este estudio, se trabajó con promastigotes de M2903 expuestos al antimonial durante más de 6 pases y al tratarlos con el extracto vegetal se obtuvieron resultados similares a los de promastigotes sensibles creciendo en presencia de dicho extracto, lo que pone en evidencia la posible utilidad de este vegetal en pacientes que desarrollen resistencia o tengan poca respuesta al tratamiento con el Glucantime. Al comparar el efecto de *Artemisia annua* en el crecimiento de los promastigotes de *L. (V) braziliensis*, (especie más común encontrada en Venezuela) con el del Glucantime, se observó que la acción del fármaco a la concentración utilizada fue menor que la de las dosis probadas del extracto vegetal, resaltando aún más la utilidad de la planta en el tratamiento de la Leishmaniasis.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio preliminar indicarían la posibilidad de usar *A. annua* en el tratamiento de la Leishmaniasis relacionada a *L. (V) braziliensis* y *L. (L) mexicana*, destacando el efecto inhibitorio en el

crecimiento del parásito y la nula toxicidad para macrófagos e, incluso, pacientes, según resultados obtenidos por otros investigadores. Ya la OMS ha señalado la utilidad de esta planta en el tratamiento de paludismo. En el caso del tratamiento de la Leishmaniasis, debido a la posibilidad del eventual desarrollo de resistencia por parte del parásito, es importante considerar la implementación de esta planta en combinación con otros compuestos, así como la realización de evaluaciones que permitan determinar la dosis más adecuada para evitar o reducir el riesgo de pérdida de susceptibilidad. También son muy importantes para este tópico aquellos estudios que permitan establecer el mecanismo de acción inhibitorio de *A. annua* sobre el crecimiento de *Leishmania spp.* A futuro, como continuación de este estudio preliminar, es de interés realizar pruebas ampliando el rango de concentraciones del extracto y las especies de *Leishmania*, en promastigotes, amastigotes y "amastigotes like", así como en modelos murinos, para conocer realmente el potencial de esta planta en el tratamiento de la Leishmaniasis.

## REFERENCIAS

- AKHOUNDI M, DOWNING T, VOTÝPKA J, KUHL S, LUKES J, CANNET A, RAVEL C, MARTY P, DELAUNAY P, KASBARI M, GRANOULLAC B, GRADONI L, SERENO D. (2017). "Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis". *Mol Aspects Med* 57: 1-29.
- AVERY M, MURALEEDHARAN K, DESAI P, BANDYOPADHYAYA A, FURTADO M, TEKWANI B. (2003). "Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. Design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of artemisinin-based drugs against leishmaniasis and malaria". *J Med Chem* 46: 4244-4258.
- BERMAN J, EDWARDS N, KIRK M, GROGL M. (1989). "Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*". *Am J Trop Med Hyg* 40: 159-164.
- DE LIMA H., BORGES R, ESCOBAR J, CONVIT J. (2010). "Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007". *Bol Mal Salud Amb* 50: 283-299.
- DE LIMA H, BORGES R, ESCOBAR J, CONVIT J. (2011). "Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009". *Bol Mal Salud Amb* 51: 215-224.
- LAYEGH P, PEZESHKPOOR F, SORURI A, NAVIAFAR P, MOGHIMAN P. (2009). "Efficacy of Cryotherapy versus intralesional Meglumine Antimoniate (Glucantime) for treatment of Cutaneous Leishmaniasis in children". *Am J Trop Med Hyg* 80: 172-175.
- MESA L, VASQUEZ D, LUTGEN P, VÉLEZ I, RESTREPO A, ORTIZ I, ROBLEDO S. (2017). "In vitro and in vivo antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans". *Rev Soc Bras Med Trop* 50(1):52-60.
- MISHINA Y, KRISHNA S, HAYNES R, MEADE J. (2007). "Artemisinin Inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* In Vitro Growth". *Antimicro Agents Chemother* 51(5): 1852-1854.
- MOREIRA E, PETRILLO-PEIXOTO M. (1991). "In vitro activity of meglumine antimoniate, a pentavalent antimonial drug, on *Leishmania promastigotes*". *Braz J Med Biol Res* 24(5): 459-469.
- GROGL M, ODUOLA A, CORDERO L, KYLE D. (1989). "*Leishmania spp.*: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure". *Exp Parasitol* 69(1): 78-90.
- HENAO H, OSORIO Y, GORE N, GÓMEZ A, TRAVI B. (2004). "Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría". *Biomédica* 24: 393-402.
- ISLAMUDDIN M, CHOUHAN G, WANT M, TYAGI M, ABDIN M, AHAL D, AFRIN F. (2014). "Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis". *Frontiers in Microbiology* 4(5): 10.3389/fmicb.2014.00626.
- ISLAMUDDIN M, CHOUHAN G, FAROOQUE A, DWARAKANATH B, SAHAL D, AFRIN F. (2015). "Th1-Based Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis". *PloS Negl Trop Dis* 9(1): e3321. doi:10.1371/journal.pntd.0003321
- MOREIRA E., DE ARAUJO R, PETRILLO-PEIXOTO M. (1995). "Glucantime susceptibility of *Leishmania promastigotes* under variable growth conditions". *Parasitol Res* 81: 291-295.
- Organización Panamericana de la Salud OPS (2019). "Informe Epidemiológico de las Américas. Leishmaniasis". Disponible on line en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>.
- PELÁEZ R. (2012). "Mecanismos de resistencia utilizados por *Leishmania spp* frente al tratamiento con medicamentos leishmanicidas. En: Técnicas Celulares y Moleculares, Fondo Editorial ITM". Compiladora: Sandra Arango. Medellín, Pp 203.
- RATH K., TAXIS K, WALZ G, GLEITER CH, LI S, HEIDE L. (2004). "Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood)". *Am J Trop Med Hyg* 70:128-132.
- RODEIRO I, DONATO M, JIMENEZ N, GARRIDO G, MOLINA-TORRES J, MENENDEZ R, CASTELL J, GOMEZ-LECHON M. (2009). "Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine". *Phytother Res* 23: 279-282.

- WEATHERS P, ARSENAULT P, COVELLI P, MCMICKLE A, TEOH K, REED D. (2011). "Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases". *Phytochem Rev* 10(2): 173–183.
- YANG D, LIEW F. (1993). "Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis". *Parasitol* 106:7–11.
- ZERPA O, CONVIT J. (2009). "Leishmaniasis Cutánea Difusa en Venezuela". *Gazeta Médica da Bahia*, 79 (3): 30-34.

# Inmunogenicidad de péptidos sintéticos de p36/LACK de *Leishmania donovani* en caninos con leishmaniasis visceral

Dennis A. Lugo<sup>1</sup>  
deallugo@gmail.com

Guillermo Terán-Ángel<sup>2</sup>  
guillermondi@gmail.com

Maira Cabrera<sup>1</sup>  
mairacab@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-1670-0541>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad de los Andes.

## RESUMEN

Diversas investigaciones han documentado que en la leishmaniasis visceral canina (LVC), causada por *Leishmania infantum/chagasi*, el tratamiento con los fármacos convencionales no logra resolver la infección. Por lo tanto, es muy importante desarrollar nuevas estrategias en el tratamiento de la LVC para controlar la propagación de la enfermedad entre los perros y de los perros a los humanos. En el presente estudio, se analizó la respuesta de citocinas inducida por 5 secuencias de epítopes derivadas de p36/LACK de *L. donovani*, seleccionadas *in silico* y sintetizadas en un estudio previo. La producción de IFN- $\gamma$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  se determinaron por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica de caninos naturalmente infectados sintomáticos (LVC) y perros sanos, estimulados *in vitro* en ausencia o presencia de fitohemaglutinina, antígenos crudos de *L. donovani* (*Ld*) y 5 péptidos sintéticos de la proteína p36/LACK. Los péptidos *p36L02*, *p36L03* y *p36L04* indujeron producción de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ). Mientras que una baja secreción de IL-6 se observó tras la estimulación con *p36L01*, *p36L02* y *p36L03*. Los péptidos no estimularon a la producción de TNF- $\alpha$  en los cultivos linfocitario de los perros parasitados. Los resultados generales sugieren que los péptidos *p36L02*, *p36L03* y *p36L04* podrían ser buenos candidatos en el desarrollo de vacunas de segunda generación y/o inmunoterapia debido a la inducción de IFN- $\gamma$  de protección.

**Palabras Clave:** leishmaniasis visceral; caninos, citocinas; epítopes; p36/LACK; péptidos sintéticos.

## IMMUNOGENICITY OF P36/LACK SYNTHETIC PEPTIDES OF *Leishmania donovani* IN CANINES WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

### ABSTRACT

Several investigations have documented that in canine visceral leishmaniasis (CVL), caused by *Leishmania infantum/chagasi*, conventional drug treatments fail to resolve the infection. Therefore, it is very important to develop new strategies of CVL treatment to control the spread of the disease between dogs and from dogs to humans. In the present study, we analyzed the cytokine response induced by 5 epitope sequences derived from *L. donovani* p36/LACK, selected *in silico* and synthesized in a previous study. The production of IFN- $\gamma$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were determined by ELISA in supernatants of peripheral blood mononuclear cell cultures from symptomatic and naturally infected canines

(CVL), stimulated *in vitro* with or without PHA, *L. donovani* (Ld) crude antigens and 5 synthetic peptides of the p36/LACK protein. Peptides p36L02, p36L03 and p36L04 induced IFN- $\gamma$  production ( $p < 0.01$ ). While a low IL-6 secretion was observed after stimulation with p36L01, p36L02 and p36L03. The peptides did not stimulate the production of TNF- $\alpha$  in the lymphocyte cultures of the parasitized dogs. Overall results suggest that the peptides p36L02, p36L03 and p36L04 might be good candidates in the development of second-generation vaccines and/or immunotherapy due to the induction of protective IFN- $\gamma$ .

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; canines; cytokines; epitopes; p36/LACK; Synthetic peptides.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) es una parasitosis severa causada principalmente por *L. (L) donovani* y *L. (L) infantum* (sinónimo *L. chagasi*). Esta enfermedad puede ser letal si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Estudios previos han demostrado que en muridos infectados con *L. (L) donovani* y caninos infectados con *L. (L) infantum*, la resistencia frente al parásito se asocia con el predominio de citocinas proinflamatorias tales como el IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , característico a respuestas inmunitarias de tipo CD4<sup>+</sup>Th1, por otro lado, se ha asociado susceptibilidad frente al parásito cuando se desarrollan respuestas de tipo CD4<sup>+</sup>Th2 (Kaye y Scott, 2011; Nieto *et al.*, 2011).

En Venezuela la LV, representa un problema de salud pública debido a la gran distribución que esta posee en nuestro país, donde el Estado Nueva Esparta es el foco endémico más estudiado (Lugo *et al.*, 2015; Zerpa *et al.*, 2003a). Diferentes trabajos han mostrado que los perros son uno de los principales reservorios domésticos y peridomésticos del parásito, éstos son fuente importante de infección para el vector, representando un alto potencial de riesgo para los humanos debido a la estrecha relación entre humanos y perros (Okuno *et al.*, 2002; Silva, 2008).

El tratamiento con quimioterapia para la LV canina es poco efectivo debido a la resistencia a los medicamentos, la toxicidad y el incumplimiento (Baxarias *et al.*, 2019; Maia *et al.*, 2010; Uliana *et al.*, 2018). De ahí la importancia en investigar nuevas alternativas terapéuticas tales como vacunas o inmunoterapias, siendo los métodos preventivos más confiable y rentables, para tratar de evitar o minimizar la transmisión del parásito entre caninos y humanos (Baxarias *et al.*, 2019; Ghorbani y Farhoudi,

2018; Gonçalves *et al.*, 2019; Singh y Sundar, 2014). En ese sentido, el antígeno p36/LACK es de particular interés como un candidato para vacuna debido a lo siguiente: tiene un rol predominante en la inmunopatogénesis de la infección; la secuencia aminoacídica de 36kDa LACK es altamente conservada en amastigotes y promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, es un análogo del receptor de la kinasa C preactivada (PKC), la cual tiene importantes funciones como mediador de las interacciones entre proteínas activadoras y/o señaladoras (Okuno *et al.*, 2002). Algunos estudios han mostrado que la p36/LACK induce protección contra *Leishmania*, a través de la inmunización con ADN-p36/LACK seguido de una re-inmunización con virus vaccinia-p36/LACK induciendo activación de respuesta de células T y protección contra *Leishmania*, en muridos (Dondji *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2007) y perros (Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008). En otro estudio, la inmunización intranasal de hámsteres con LACK ADN activó el desarrollo de una respuesta inmune que le permitió a estos animales resistir un reto con *L. (L) chagasi* (De Oliveira Gomes *et al.*, 2011). Sin embargo, en caninos poco se conoce del posible rol protector de la p36/LACK y su potencial uso en el desarrollo de inmunoterapias para estos animales, por eso nos propusimos evaluar en linfocitos de perros con LVC, la respuesta de citocinas pro-inflamatorias luego de estimulación con cinco determinantes antigénicos derivados de la p36/LACK, identificados previamente por nosotros (Terán-Ángel *et al.*, 2007).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Péptidos

Los péptidos sintéticos derivados de la proteína p36/LACK de *L. donovani* evaluados, fueron los siguientes: p36L01 (97-114 GQCQRKFLKHTKDVLA), p36L02 (129-152 VIRVWNVAGECMHEFLRDGHEDW), p36L03 (171-188 SWDNTIKVWNVNGGKCER), p36L04 (184-199 GKCERTLKGHSNYVSTV) y p36L05 (292-309 NTLYSGHKDNLIRVWSIS). Los mismos fueron

identificados previamente por nosotros (Terán-Angel *et al.*, 2007). Fueron sintetizados en fase sólida y purificados (>90%) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) por el laboratorio de Síntesis de Péptidos del Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina – UCV, Venezuela.

### Población de estudio

Se estudiaron 24 perros domésticos con infección natural por *L. infantum/chagasi* provenientes de zonas endémicas de la Isla de Margarita (estado Nueva Esparta, Venezuela) y 12 caninos clínicamente sanos, del bioterio de la Escuela de Medicina José María Vargas (UCV).

Los caninos se seleccionaron acorde a la presencia de tres o más signos clínicos: pérdida de peso, opacidad corneal, onicogrifosis, alopecia, úlceras cutáneas, hepatoesplenomegalia y ganglios linfáticos palpables (Alvar *et al.*, 2004). Posteriormente, el diagnóstico de Leishmaniasis visceral canina (LVC) fue confirmado en el Laboratorio de Leishmaniasis de la Corporación de Salud (CORPOSALUD) del MPPS (estado Nueva Esparta, Venezuela), mediante el método serológico con rK39, (kinesina de *L. infantum/chagasi*, epítipo inmunodominante reconocido por linfocitos B) (Badaró *et al.*, 1996; Braz *et al.*, 2002; Terán-Ángel *et al.*, 2010). Método de alta sensibilidad y especificidad utilizado de rutina en Venezuela para la confirmación del diagnóstico de LV humana y canina (Zerpa *et al.*, 2003b).

La manipulación de los animales, se llevó a cabo siguiendo los lineamientos del Código de Ética para la Vida del MPPCTI (Código de Ética para la Vida, 2010), capítulo 3 y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina UCV-MPPS. La recolección de datos y muestras biológicas de los perros fueron realizados bajo consentimiento informado de sus dueños.

Se tomaron muestras de sangre periférica por venopunción a 24 perros con LVC y 12 perros sanos incluidos en el estudio (rK39 negativos), para la obtención de suero y cultivo *in vitro* de células mononucleares.

### Cultivo linfocitario *in vitro* con péptidos

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC), fueron aisladas de 20 mL de sangre venosa heparinizada de perros con LVC y perros sanos mediante la modificación de un protocolo descrito previamente (Ramayo *et al.*, 2005). Brevemente, se realizó un gradiente de densidad con Lymphoprep™ (STEMCELL™) y con sangre heparinizada, diluidas 1:1 en solución de PBS estéril pH 7,2 a 400g durante 20 min. El halo enriquecido con células mononucleares se colectó y lavó tres veces en PBS, Las células obtenidas se suspendieron en RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Gibco®), Las células fueron dispensadas por triplicado para cada condición experimental, en placas fondo plano estériles de 96 pozos (Nunc Thermo Scientific) a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pozo y se estimularon con 20 µg/mL de p36L01, p36L02, p36L03, p36L04, p36L05, fitohemaglutinina (PHA; 1 µg/pozo), antígeno crudo de *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80/DD8)  $2 \times 10^5$  parásitos/pozo o solo medio RPMI suplementado. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A los 3 días, se colectaron 100 µL/pozo de sobrenadante para la condición de estimulación con fitohemaglutinina y a los 5 días para los cultivos estimulados con *L. donovani* y los péptidos bajo estudio, se almacenó a 70°C para posterior evaluación de citocinas.

### Determinación de citocinas

Las concentraciones de IFN-γ, TNF-α e IL-6 en los sueros y sobrenadantes de los cultivos linfocitarios de los perros con LVC y sanos, se determinaron mediante ELISA de captura comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, MN, USA). Las concentraciones de cada citocina se obtuvieron a partir de una curva patrón construida con recombinante de cada citocina suministradas por los kits (Canine TNF-α DuoSet®, sensibilidad: 15,6 - 1000 µg/mL; Canine IFN-γ, DuoSet®, sensibilidad: 31,2 - 2000 µg/mL; Canine IL-6 DuoSet®, sensibilidad: 62,5 - 4000 µg/mL; R&D Systems, MN, USA). Los resultados fueron expresados en µg/mL.

## Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos para cada parámetro evaluado fueron establecidas mediante el test de Mann-Whitney. Las comparaciones fueron consideradas significativas cuando  $p < 0,05$ . Para los análisis se usó el programa Prism 5 para Windows, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc. 2007).

## RESULTADOS

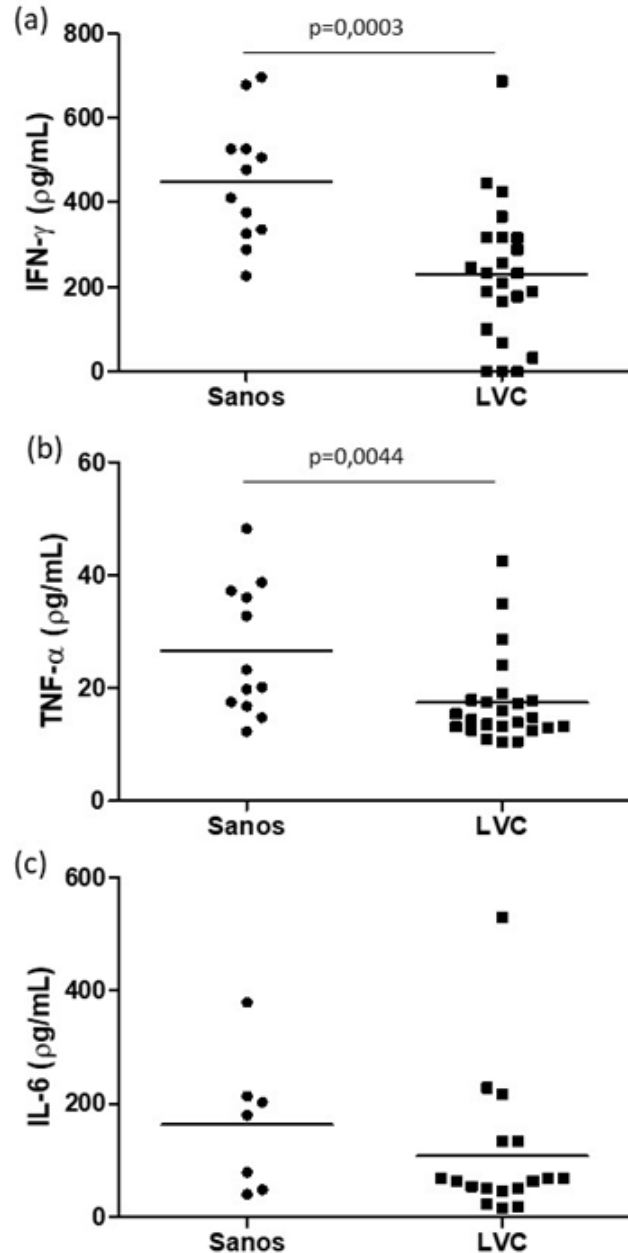
### Evaluación serológica de los perros con LVC

Para estudiar la inmunogenicidad de los péptidos, se decidió previamente evaluar el estado inmunológico de los perros bajo estudio (LVC y sanos), para ello se les determinaron las concentraciones séricas de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 1).

En los perros enfermos se evidenció una menor ( $p < 0,05$ ) concentración de IFN- $\gamma$  ( $228,82 \pm 163,69$   $\mu\text{g/mL}$ ) y de TNF- $\alpha$  ( $17,37 \pm 7,85$   $\mu\text{g/mL}$ ) respecto a lo encontrado en los perros sanos:  $447,8 \pm 147,49$   $\mu\text{g/mL}$  para IFN- $\gamma$  y  $26,45 \pm 11,6$   $\mu\text{g/mL}$  para TNF- $\alpha$  (Figura 1a y 1b). En contraste, no evidenciamos diferencias significativas en la concentración sérica de IL-6, entre ambos grupos de caninos (Figura 1c).

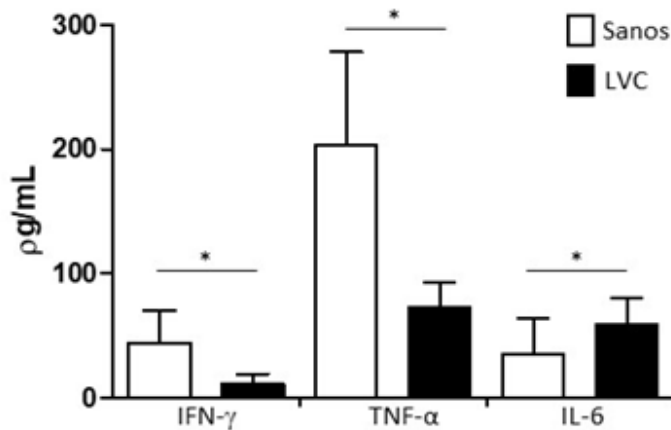
### Respuesta de citocinas en cultivos de PBMC estimulados con PHA, *L. donovani* y los péptidos sintéticos de p36/LACK

La figura 2 muestra la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) promedio + desviación estándar de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en respuesta al mitógeno PHA, en los cultivos linfocitarios de los caninos sintomáticos y sanos. Las células de los perros sanos produjeron mayores ( $p < 0,05$ ) concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en respuesta a la PHA ( $44,4 \pm 25,7$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $203,8 \pm 74,5$   $\mu\text{g/mL}$ ; respectivamente) comparado con lo encontrado en los perros con LVC ( $10,8 \pm 8,0$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $72,6 \pm 20,2$   $\mu\text{g/mL}$ ; respectivamente). Mientras que, la IL-6 detectada en los sobrenadantes de los cultivos celulares de los perros infectados ( $58,6 \pm 21,6$   $\mu\text{g/mL}$ ) estuvo incrementada significativamente ( $p < 0,05$ ) comparado con los perros sanos ( $34,2 \pm 29,9$   $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 1.** Concentraciones séricas de citocinas de caninos con LVC y sanos. (a) citocina Th1 IFN- $\gamma$ , (b) y (c) citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6.

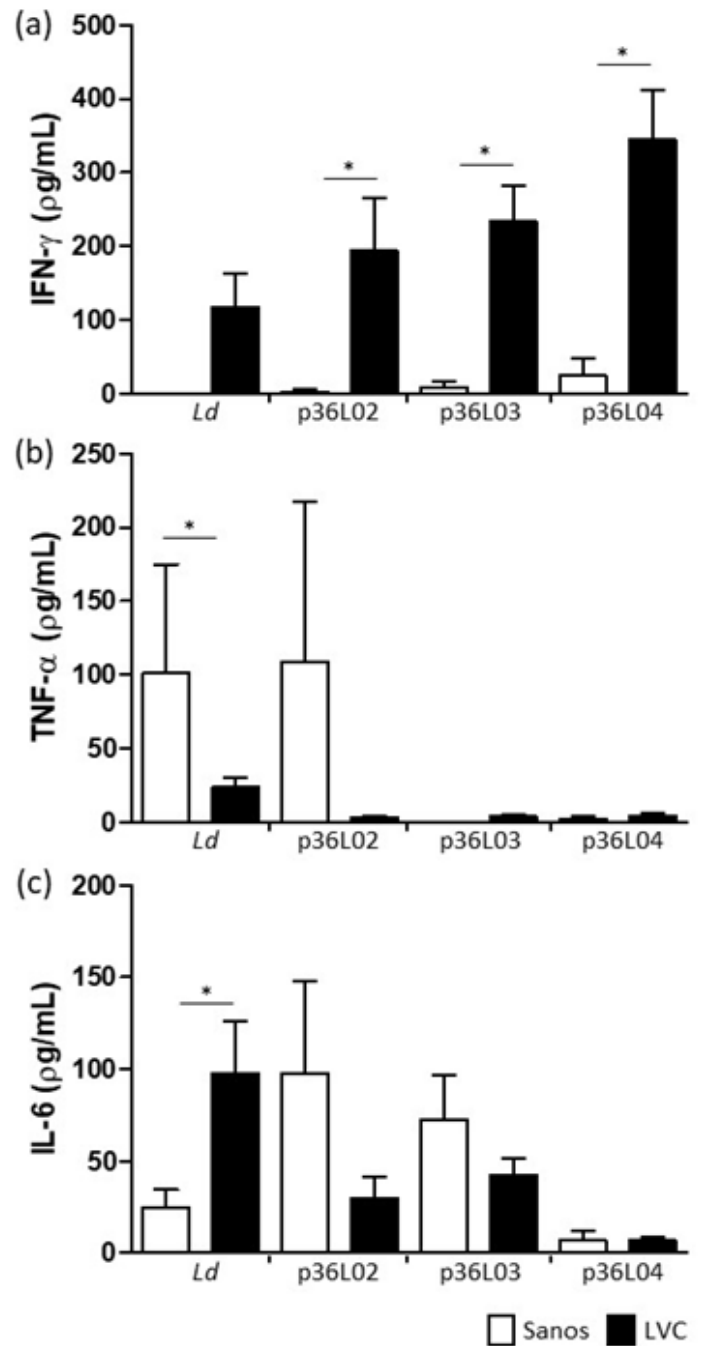
La respuesta de citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 luego estimulación de las PBMC de caninos sintomáticos y controles sanos con antígeno crudo de *Ld* o los péptidos epítopes de p36/LACK se representa en la figura 3. Los perros con LVC mostraron una disminución de TNF- $\alpha$  y un incremento IL-6 significativos luego de estimulación con *Ld* comparado con lo observado en los perros sanos.



**Figura 2.** Producción de citocinas en cultivos de linfocitos de caninos con Leishmaniasis visceral (LVC) y perros sanos estimulados con PHA. \*  $p < 0,05$ .

Los péptidos de p36/LACK indujeron una respuesta de citocinas en más del 20% de la población de los perros con LVC y sanos. Interesantes resultados obtuvimos con tres de ellos (*p36L02*, *p36L03* y *p36L04*), cuya respuesta de IFN- $\gamma$  en los caninos infectados *p36L02* ( $194,0 \pm 70,7$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *p36L03* ( $233,6 \pm 49,3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y *p36L04* ( $344,8 \pm 68,3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la obtenida en respuesta al antígeno crudo de *Ld* ( $117,4 \pm 45,6$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figura 3a). Más aun, la respuesta de IFN- $\gamma$  asociada a estas secuencias (*p36L02*, *p36L03* y *p36L04*) resultó ser mucho mayor ( $p < 0,01$ ) en los perros infectados comparado con los sanos.

En la Figura 3b, se puede apreciar que en los perros con LVC, estos péptidos no indujeron producción de TNF- $\alpha$ , en contraste a lo observado previamente bajo el estímulo con *Ld* ( $23,6 \pm 6,4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Adicionalmente, respecto a la IL-6, demostramos que a diferencia de lo obtenido en los cultivos estimulados con *Ld* para perros infectados, los péptidos *p36L02*, *p36L03* y *p36L04* no indujeron una producción importante de esta citocina. Finalmente, los péptidos *p36L01* y *p36L05* no indujeron una producción significativa de las citocinas estudiadas (datos no mostrados).



**Figura 3.** Producción de citocinas en cultivos de linfocitos de caninos con Leishmaniasis visceral (LVC) y perros sanos estimulados con *L. donovani* (*Ld*) y péptidos. (a) citocina Th1 IFN- $\gamma$ . (b) y (c) Citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6. \*  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

Es conocido que en leishmaniasis visceral, la principal respuesta protectora frente al parásito *Leishmania*, es inducida principalmente por la respuesta inmune de tipo CD4<sup>+</sup> Th1, caracterizada

por la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Este tipo de respuesta está relacionada con la regulación positiva de la actividad leishmanicida en los macrófagos (Gonçalves *et al.*, 2019; Koutinas y Koutinas, 2014), principal mecanismo efector de la muerte intracelular de los amastigotes de *Leishmania* (Barbiéri, 2006; Scott y Novais, 2016). En este sentido, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , son predominantes en perros asintomáticos, lo que demuestra su potencial protector contra la enfermedad (Costa-Pereira *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2010).

Los perros incorporados en nuestro estudio, con diagnóstico confirmado de LVC por criterios clínicos y la seropositividad a la prueba con rK39, también presentaron pobres niveles serológicos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Resultados similares se han reportado en otras investigaciones, en las cuales se ha evidenciado que los perros con baja respuesta de estas citocinas (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) presentaban sintomatología clínica (Barbiéri, 2006; Boggiatto *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010) con una mayor parasitemia (Martínez-Orellana *et al.*, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estos estudios, tampoco encontraron diferencias en las concentraciones serológicas de IL-6 en perros con LVC (Rodríguez *et al.*, 2010).

Con relación a las respuestas *in vitro*, se ha observado en caninos, que los linfocitos de animales polisintomáticos con LVC estimulados con antígenos crudos de *Leishmania spp* producen concentraciones bajas de IFN- $\gamma$ , IL-18, TNF- $\alpha$  e IL-10, lo cual concuerda con nuestros hallazgos (Carrillo y Moreno, 2009). En estos estudios también han reportado, concentraciones significativas de IL-6 en respuesta a los estímulos específicos ya mencionados (Dayakar *et al.*, 2019). Nuestra investigación reprodujo estas observaciones: las células mononucleares de caninos con LVC mostraron una mayor producción de IL-6 en respuesta a la PHA y al antígeno crudo de *L. donovani*. Lo cual indica que la baja producción de citocinas proinflamatorias junto a los elevados niveles de IL-6 está vinculada con la progresión de la enfermedad.

Estudios con p36/LACK han demostrado que es esencial para la viabilidad del parásito y para su

establecimiento en el huésped.

La respuesta inmunológica a esta molécula ha sido estudiada y utilizada para estudios experimentales de vacunas (De Oliveira Gomes *et al.*, 2011; Dondji *et al.*, 2005; Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008), también se ha utilizado como herramienta para investigar mecanismos relacionados con inmunidad y se ha ensayado en varios experimentos de inmunización, proporcionando resultados heterogéneos (Alcolea *et al.*, 2019; Evans y Kedzierski, 2012).

Mediante el análisis *in silico* de p36/LACK de *L. donovani*, (99% homóloga con la de *L. infantum/chagasi* especie infectante de los caninos estudiados) hemos seleccionado 5 péptidos epítopes, en un estudio previo. Estos péptidos constituyen epítopes T ya que tienen estructura  $\alpha$ -hélice anfipática con patrones repetitivos conocidos por unirse a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II (Terán-Ángel *et al.*, 2007).

En el presente estudio, evidenciamos que tres de los cinco péptidos, pudieron ser reconocidos por los linfocitos T de los caninos sintomáticos y activarlos. Como lo refleja la producción de IFN- $\gamma$  asociada a las secuencias p36L02, p36L03 y p36L04, que resultó ser mucho mayor en los perros infectados que en los sanos. Esto sugiere que estos péptidos son epítopes inmuno-dominantes dentro de la molécula p36/LACK, involucrados en el desarrollo de una respuesta mediada por células T, que incluye la estimulación y proliferación de células productoras de citocinas como IFN- $\gamma$ , que potenciaría la actividad anti-*Leishmania* mediada por radicales de oxígeno y el óxido nítrico, esenciales para la protección y/o curación de la LV (Dias *et al.*, 2018; Reed *et al.*, 2016; Singh y Sundar, 2014).

Con respecto al TNF- $\alpha$ , no encontramos una producción importante de esta citocina en los cultivos linfocitarios de perros con LV al estimularlos con el antígeno crudo de *Ld* y los 5 péptidos. El TNF- $\alpha$  junto con el IFN- $\gamma$ , se asocian con respuestas Th1, por lo que esperábamos una respuesta similar a la obtenida con el IFN- $\gamma$ , sin embargo, esto no fue así. Probablemente el TNF- $\alpha$  pudo haberse producido

tempranamente y para el momento en que se colectaron los sobrenadantes de los cultivos estimulados con *Ld* y péptidos, éste podría haberse consumido.

Ninguno de los péptidos indujo una producción evidente de IL-6, resultado alentador puesto que esta citocina se ha relacionado con la progresión de la enfermedad en humanos y caninos (Dayakar *et al.*, 2019).

Las vacunas clásicas contra la leishmaniasis han estado basadas en el uso de parásitos atenuados o subunidades del mismo, lo cual es desventajoso porque consisten en un amplio rango de determinantes antigénicos capaces de activar respuestas protectoras o respuestas inadecuadas. En contraste, el uso de péptidos en vacunas e inmunoterapias tiene varios beneficios como lo son: buena estabilidad, ausencia de toxicidad, baja complejidad y bajo costo. Por lo cual, si se acompaña de un adjuvante apropiado puede ser de utilidad en el desarrollo de una vacuna terapéutica (De Brito *et al.*, 2018).

En conclusión, estos resultados sugieren el potencial inmunogénico de estos péptidos: *p36L02*, *p36L03* y *p36L04*, los cuales pudieran ser considerados como base en el desarrollo de terapias alternativas por asociarse con una alta producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos de los perros con LVC, que podría contribuir con su recuperación.

## REFERENCIAS

ALCOLEA PJ, ALONSO A, ESTEBAN A, PERIS P, CORTÉS A, CASTILLO JA, LARRAGA V. (2019). "IL12 p35 and p40 subunit genes administered as pPAL plasmid constructs do not improve protection of pPAL-LACK vaccine against canine leishmaniasis". *PLoS One* 14: e0212136.

ALVAR J, CAÑAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. (2004). "Canine leishmaniasis". *Adv Parasitol* 57:1–88.

BADARÓ R, BENSON D, EULÁLIO MC, FREIRE M, CUNHA S, NETTO EM, PEDRAL-SAMPAIO D, MADURCIRA C, BURNS JM, HOUGHTON RL, DAVID JR, REED SG. (1996). "rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis". *J Infect Dis* 173:758–761.

BARBIÉRI CL. (2006). "Immunology of canine leishmaniasis". *Parasite Immunol* 28:329–337.

BAXARIAS M, MARTÍNEZ-ORELLANA P, BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. (2019). "Immunotherapy in clinical canine leishmaniasis: a comparative update". *Res Vet Sci* 125:218–226.

BOGGIATTO PM, RAMER-TAIT AE, METZ K, KRAMER EE, GIBSON-CORLEY K, MULLIN K, HOSTETTER JM, GALLUP JM, JONES DE, PETERSEN CA. (2010). "Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection". *Clin Vaccine Immunol* 17:267–273.

BRAZ RFS, NASCIMENTO ET, MARTINS DRA, WILSON ME, PEARSON RD, REED SG, JERONIMO SMB. (2002). "The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection". *Am J Trop Med Hyg* 67:344–348.

CARRILLO E, MORENO J. (2009). "Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis". *Vet Immunol Immunopathol* 128:67–70.

MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA CIENCIA, TECNOLOGÍA E INDUSTRIAS INTERMEDIAS. (2010). "Código de Ética para la Vida", Caracas, Venezuela.

COSTA-PEREIRA C, MOREIRA ML, SOARES RP, MARTELETO BH, RIBEIRO VM, FRANÇA-DIAS MH, CARDOSO LM, VIANA KF, GIUNCHETTI RC, MARTINS-FILHO OA, ARAÚJO MSS. (2015). "One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis". *BMC Vet Res* 11:92.

DE BRITO RC, CARDOSO JM, REIS LES, VIEIRA J, MATHIAS FAS, ROATT BM, RODRIGO AGUIAR-SOARES RD, RUIZ JC, RESENDE D, REIS A. (2018). "Peptide vaccines for leishmaniasis". *Front Immunol* 9:1043.

DE OLIVEIRA GOMES DC, DA SILVA COSTA SOUZA BL, DE MATOS GUEDES HL, LOPES UG, ROSSI-BERGMANN B. (2011). "Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*". *Parasitology* 138:1892–1897.

DIAS DS, RIBEIRO PAF, MARTINS VT, LAGE DP, RAMOS FF, DIAS ALT, RODRIGUES MR, PORTELA ÁSB, COSTA LE, CALIGIORNE RB, STEINER BT, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, SALLES BCS, SANTOS TTO, SILVEIRA JAG, MAGALHÃES-SOARES DF, ROATT BM, MACHADO-DE-ÁVILA RA, DUARTE MC, MENEZES-SOUZA D, SILVA ES, GALDINO AS, COELHO EAF. (2018). "Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis". *Cell Immunol* 323:59–69.

DAYAKAR A, CHANDRASEKAN S, KUCHIPUDI SV, KALANGE SK. (2019). "Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostic and immunotherapy". *Front Immunol* 10/article 670.

- DONDJI B, PÉREZ-JIMENEZ E, GOLDSMITH-PESTANA K, ESTEBAN M, MCMAHON-PRATT D. (2005). "Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis". *Infect Immun* 73:5286–5289.
- EVANS KJ, KEDZIERSKI L. (2012). "Development of vaccines against visceral leishmaniasis". *J Trop Med* 2012: 892817.
- GHORBANI M, FARHOUDI R. (2018). "Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy?". *Drug Des Devel Ther* 12:24-40.
- GOMES DC DE O, PINTO EF, MELO LDB, DE LIMA WP, LARRAGA V, LOPES UG, ROSSI-BERGMANN B. (2007). "Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice". *Vaccine* 25:2168–2172.
- GONÇALVES AAM, LEITE JC, RESENDE LA, MARIANO RM DA S, SILVEIRA P, MELO-JÚNIOR OA DE O, RIBEIRO HS, DE OLIVEIRA DS, SOARES DF, SANTOS TAP, MARQUES AF, GALDINO AS, MARTINS-FILHO OA, DUTRA WO, DA SILVEIRA-LEMOS D, GIUNCHETTI RC. (2019). "An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy". *Front Cell Infect Microbiol* 9:427.
- KAYE P, SCOTT P. (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface". *Nat Rev Microbiol* 9:604–615.
- KOUTINAS AF, KOUTINAS CK. (2014). "Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*". *Vet Pathol* 51:527–538.
- LUGO DA, ORTEGA-MORENO ME, RODRÍGUEZ V, BELIZARIO DC, GALINDO WA, CABRERA GONZÁLEZ M, ZERPA O, SÁNCHEZ MA. (2015). "Seroprevalencia de la Leishmaniasis Visceral Canina Mediante Elisa con rK39 en Focos Endémicos de Venezuela". *Rev Fac Ciencias Vet UCV* 56:42–51.
- MAIA C, NUNES M, CRISTÓVÃO J, CAMPINO L. (2010). "Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up". *Acta Trop* 116:193–199.
- MARTÍNEZ-ORELLANA P, MARÍ-MARTORELL D, MONTSERRAT-SANGRÀ S, ORDEIX L, BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. (2017). "*Leishmania infantum*-specific IFN- $\gamma$  production in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis at diagnosis and during treatment". *Vet Parasitol* 248:39–47.
- NIETO A, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, ORDEN JA, DE LA FUENTE R, MADRID-ELENA N, CARRIÓN J. (2011). "Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model". *Vet Res* 42:39.
- OKUNO T, TAKEUCHI M, MATSUMOTO Y, OTSUKA H, MATSUMOTO Y. (2002). "Pretreatment of leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK) promotes disease progression caused by *Leishmania amazonensis*". *Exp Anim* 51:335–341.
- RAMAYO L, SOBA M, MUNDO S. (2005). "Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*". *In Vet* 7:63–70.
- RAMIRO MJ, ZÁRATE JJ, HANKE T, RODRIGUEZ D, RODRIGUEZ JR, ESTEBAN M, LUCIENTES J, CASTILLO JA, LARRAGA V. (2003). "Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK". *Vaccine* 21:2474–2484.
- RAMOS I, ALONSO A, MARCEN JM, PERIS A, CASTILLO JA, COLMENARES M, LARRAGA V. (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response". *Vaccine* 26:333–344.
- REED SG, COLER RN, MONDAL D, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. (2016). "*Leishmania* vaccine development: Exploiting the host-vector-parasite interface". *Expert Rev Vaccines* 15:81-90.
- RODRÍGUEZ OL, CABRERA M, RODRÍGUEZ V, ULRICH M, QUIJADAY JD, SÁNCHEZ MA. (2010). "Estudio preliminar de citocinas en suero de perros con Leishmaniasis visceral en una zona endémica venezolana". *Rev Fac Ciencias Vet* 51:43–50.
- SILVA R. (2008). "Factores de riesgo involucrados en la infección por *Leishmania infantum* / *L. chagasi*". *Rev Inst Nac Hig* 39:35–41.
- SCOTT P, NOVAIS FO. (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis". *Nat Rev Immunol* 16:581–592.
- SINGH OP, SUNDAR S. (2014). "Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects". *Front Immunol* 5:296.
- SOLANO-GALLEGO L, KOUTINAS A, MIRÓ G, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, BOURDEAU P, OLIVA G, BANETH G. (2009). "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis". *Vet Parasitol* 165:1-18.
- TERÁN-ÁNGEL G, RODRÍGUEZ V, SILVA R, ZERPA O, SCHALLIG H, ULRICH M, CABRERA M. (2010). "Herramientas no invasivas en Venezuela: Comparación entre las pruebas inmunoserológicas DAT, rK26 y rK39 en el diagnóstico de leishmaniasis visceral". *Biomedica* 30:39–45.
- TERÁN-ANGEL G, SILVA B, CABRERA M. (2007). "Identificación de determinantes antigénicos lineales en la proteína p36/LACK de *Leishmania donovani*". XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Porlamar, Nueva Esparta, Venezuela.
- ULIANA SRB, TRINCONI CT, COELHO AC. (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges". *Parasitology* 145:464-480.
- ZERPA O, ULRICH M, BORGES R, RODRÍGUEZ V, CENTENO M, NEGRÓN E, BELIZARIO D, CONVIT J. (2003a). "Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela". *Pan Am J Public Heal* 13:239–245.

ZERPA O, ULRICH M, CONVIT J, BENÍTEZ M, BLANCO B, FELICIANGELI D, NEGRÓN E, RODRÍGUEZ N, SÁNCHEZ MA, TAPIA FJ, GARCÍA B. (2003b). "Programa control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela". Instituto de Biomedicina. Venezuela.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a la Dirección Regional de Salud del Estado Nueva Esparta, Coordinación de Zoonosis por el apoyo en la selección de los perros y a la Lic Melcenia Moreno por el transporte de las muestras a Caracas. Este trabajo recibió el financiamiento del CDCH-UCV y el FONACIT proyecto grupal N° G2005000375.

# Leishmaniasis visceral: Aproximación a un programa de control integral en áreas endémicas del estado Nueva Esparta, Venezuela.

**Martín A. Sánchez<sup>1</sup>**  
martinsanchez1@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-5011-9702>

**Bailde García Guevara<sup>2</sup>**  
baildemaria@gmail.com

**Antonio Salgado<sup>2</sup>**  
salgado.sa@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, caracterizada por un espectro de manifestaciones clínicas en humanos y causada por diversas especies del parásito *Leishmania*. A diferencia de la Leishmaniasis cutánea americana (LCA) considerada una antroponosis, la Leishmaniasis Visceral (LV) es una zoonosis mortal y en Latinoamérica el agente causal es *Leishmania infantum*, afectando principalmente a niños menores de diez (10) años en los que se registra una alta tasa de mortalidad en zonas endémicas, constituyendo así un grave problema de salud pública. El perro doméstico es el principal reservorio de esta enfermedad y a su vez puede o no padecer signos y síntomas de la misma, llevando a la muerte del canino. La tenencia de perros domésticos representa un factor de riesgo en zonas endémicas y por lo tanto, las medidas de control de la enfermedad no deben abordarse de la misma manera que la LCA. En ese sentido, el programa integral de control de esta endemia se asume desde una perspectiva donde juega un papel estratégico la educación para la salud y participación social enfocado en la premisa: Formar para transformar, teniendo como norte el fortalecimiento del personal de salud en atención primaria, como multiplicadores en las comunidades endémicas, aunado a las actividades de control de caninos ejecutadas por la Dirección de Zoonosis, lo cual, puede modificar positivamente los indicadores del programa de control en forma progresiva y sostenible. Se aplicó una metodología de aprender/haciendo, a través de un proceso de talleres con la inclusión de un sistema de georeferenciación como una herramienta de comprensión geoespacial del comportamiento de la endemia, para garantizar el uso eficiente de los recursos y la eficacia en la aplicación de las medidas de control.

**Palabras Clave:** Programa Control; Leishmaniasis Visceral; Educación para la salud; Georeferencia; SIG.

## VISCERAL LEISHMANIASIS: APPROACH TO A CONTROL PROGRAM BASED IN HEALTH EDUCATION AND GEOREFERENCE

### ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease, characterized by a spectrum of clinical manifestations in humans and caused by various species of the parasite

*Leishmania*. Unlike American cutaneous leishmaniasis (ACL) considered an anthroponosis, Visceral Leishmaniasis (LV) is a fatal zoonosis and in Latin America the causative agent is *Leishmania infantum*, mainly affecting children younger than ten (10) years in which it is recorded a high mortality rate in endemic areas, thus constituting a serious public health problem. The domestic dog is the main reservoir of this disease and in turn may or may not suffer signs and symptoms of it, leading to the death of the canine. The possession of infected domestic dogs represents a risk factor in endemic areas. Therefore disease control measures should not be addressed in the same way as ACL. In this sense, the comprehensive control program of this endemic is assumed from a perspective where health education and social participation play a strategic role focused on the premise: Training to transform and specifically directed to the training of health personnel in primary care and these as multipliers in endemic communities, together with canine control activities performed by the zoonotic office, can positively modify the indicators of the control program in a progressive and sustainable way. The inclusion of a georeference system as a comprehensive geospatial tool of the behavior of the endemicity, guarantees the efficient use of resources and the effectiveness in the application of control measures.

**Keywords:** Control Program; Leishmaniasis; Visceral; Health Education; Georeference; GSI.

## INTRODUCCIÓN

El término leishmaniasis describe a un conjunto de enfermedades causadas por la infección con alguno de los protozoos del género *Leishmania* que se transmite al ser humano y a otros hospedadores vertebrados a través de la picadura de insectos de la familia Psychodidae, del género *Phlebotomus* en Europa, Medio Oriente, Asia y África; y el género *Lutzomyia* en América (Sanchez y Tapia, 2005; David, 2009).

Las Leishmaniasis como síndrome de manifestaciones clínicas en humanos que van desde lesiones simples y autolimitadas de la Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), pasando por las múltiples incapacitantes y estigmatizantes lesiones en la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) o la destrucción de la mucosa naso-oro faríngea en la leishmaniasis mucocutánea (LCM), hasta las manifestaciones fatales de hepato-esplenomegalia y fallo sistémico generalizado que conlleva a la muerte en la leishmaniasis visceral (LV), representan un grave problema de salud pública en Venezuela y el mundo.

Particularmente la Leishmaniasis visceral, la cual afecta principalmente a una población altamente vulnerable como son los niños menores de 10 años que viven en precarias condiciones socio-económicas, donde el 70% son menores de 4 años y en los que se registra una alta tasa de mortalidad (Sánchez *et al.*, 2005). La leishmaniasis es una enfermedad de prevalencia alta en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo afectando a más de 98 países, estimándose que entre 0,7 a 1,2 millones de nuevos casos de LC y de 200 a 400 mil nuevos casos de LV se producen anualmente a nivel mundial. Ampliamente distribuida principalmente en Las Américas, La Cuenca Mediterránea, Asia central y el Medio Oriente. El 70 a 75% de la incidencia global de LC se concentra en pocos países como Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Etiopia, Irán, Nicaragua, Perú, Sudan y Siria (PAHO-WHO, 2017).

Por su parte LV en las Américas es endémica en al menos 12 países, donde se han registrado 63.331 casos nuevos del 2001 al 2018, con un promedio de 3.518 casos por año (OPS 2019).

En Venezuela la incidencia de LV en pacientes diagnosticados por sintomatología clínica ha alcanzado hasta los 50 casos anuales donde el subregistro de casos puede ser del orden de tres veces más el número reportado, siendo conocido en dispersos focos de las áreas central, sur este y oeste del país (Feliciangeli, 1991; Zulueta *et al.*, 1999). En estudios epidemiológicos realizados en la Isla de Margarita, en el estado Nueva Esparta (Zerpa *et al.*, 2000) se señaló un importante aumento en la incidencia de LV en esta área, con potencial magnitud epidemiológica si se compara con la incidencia de casos reportados en otros estados del país. En Venezuela, desde el año 1997 hasta el 2018 se notificaron 803 casos de LV humana en 24 estados con una tasa de incidencia promedio de 0,15 por 100.000 habitantes (Instituto de Biomedicina, 2020) de los cuales, 178 (23%) correspondían a casos reportados en el estado Nueva Esparta. Los reportes iniciales demostraron que la mortalidad en pacientes con LV fue de 7,85% durante el período 1995-2000 (Ortiz *et al.*, 2003), luego de la implantación de un programa de control a nivel nacional las estadísticas

cambiaron radicalmente, observándose incrementos en el número de casos reportados en entidades donde tradicionalmente no existían casos autóctonos de LV, como Trujillo, Zulia, Yaracuy, Portuguesa y Falcón entre otros, así mismo, la tasa de mortalidad disminuyó a un 2.8 % en el período 2003-2016) (Lugo *et al.*, 2015, Instituto de Biomedicina, 2016).

En zonas endémicas de LV la población canina constituye el principal reservorio de parásitos. En Venezuela, particularmente en el estado Nueva Esparta el diagnóstico serológico mediante ELISA utilizando el antígeno rK39 de *L. chagasi* y promastigotes de *L. donovani*, demostró una alta susceptibilidad frente a *L. chagasi* en la población canina, con un incremento en la transmisión en un período de 10 meses de estudio, determinado por el aumento de positividad del ELISA a ambos antígenos de un 24% al inicio del estudio hasta un 40% al final del período (Zerpa *et al.*, 2000).

## **Factores determinantes en la LV y Programas de Control**

Existen una multiplicidad de factores determinantes en la endemidad de una zoonosis como la Leishmaniasis visceral que van desde las condiciones climáticas y geográficas, que favorecen la presencia del vector hasta las políticas públicas de control a nivel nacional o regional así como el comportamiento social de la población en área endémica en torno a la enfermedad, en donde la profilaxis y las conductas de tenencia y cuidado del perro doméstico como principal reservorio y hospedador del parásito son determinantes.

De acuerdo a varios estudios epidemiológicos y sobre el control de la LV en la región de las Américas, se ha reportado que el éxito y el impacto de las estrategias de control implementadas en las zonas endémicas de LV dependen de la disponibilidad de recursos económicos y necesariamente del conocimiento y las actitudes de la población frente a la enfermedad, que garanticen su participación activa en la implementación de las medidas profilácticas (OPS-OMS-MPPS, 2019). Gran parte de la alta prevalencia de la LV se debe a la profundización de las inequidades y desigualdades sociales, aspectos

considerados básicos para el desarrollo humano y la justicia social. Según García, G.B (2010), esta se expresa de diferentes formas, entre ellas: la igualdad de oportunidades de los individuos y comunidades en tener acceso y utilización oportuna a los servicios de salud de acuerdo a sus necesidades.

La ausencia de políticas sostenibles para el control de la enfermedad; déficit o ausencia de un sistema básico de servicios públicos; insuficiente capacidad de coordinación transectorial; escasas investigaciones operacionales en epidemiología, educación y participación comunitaria y el deterioro progresivo del medio ambiente, entre las más importantes (García, 2007; García y Borges, 2010).

### **Programas de control:**

La mayoría de los programas de control en los diferentes países endémicos de Leishmaniasis están dirigidos a disminuir el riesgo de infección en humanos al reducir la prevalencia en caninos. Es por esto que las medidas de control se centran en el diagnóstico de casos caninos y eliminación de perros infectados en áreas endémicas, a la par con los rociamientos con piretroides y organofosforados para controlar el vector y reducir el riesgo de transmisión. Usualmente se toma un radio de doscientos metros alrededor del domicilio del caso humano confirmado para el muestreo de humanos y caninos (Zerpa *et al.*, 2003). Sin embargo estas medidas han demostrado no ser del todo efectivas si no se integra un programa de educación para la salud en las comunidades afectadas. Esto implica cambiar estructuralmente el enfoque convencional de educación en salud a nivel institucional de forma lineal y generalizada a todas las comunidades, sin valorar su perfil sociocultural específico, referente clave para la transferencia del conocimiento sujeto a sujeto, es decir personal de salud y comunidades desde una perspectiva intersubjetiva del manejo del conocimiento de la salud como valor, y en ella como se articula un sistema de educación y vigilancia epidemiológica dirigido a controlar la infección desde un enfoque integrador de la endemia. Por otra parte la salud no se puede considerar aisladamente, depende enormemente de la calidad del ambiente en que se vive.

Esto significa considerar el enfoque ecosistémico para la prevención de las enfermedades infecciosas, el cual contempla impulsores de riesgo en términos de los valores ecológicos, sociales, culturales, políticos y económicos; factores subyacentes que afectan la dinámica de la transmisión. Al igual que otros problemas de salud, la ecología y la transmisión de la mayoría de las enfermedades infecciosas se puede vincular a las interacciones entre varios factores, por ejemplo, los cambios demográficos, la pobreza, la urbanización, la deforestación, cambios en los modelos agrícolas de producción. Las relaciones entre las personas y los animales cambian la gestión de los recursos naturales y las diferencias de género y patrones culturales (Bazzani y Wiese, 2012).

Por tanto, ante los cambios acelerados de la sociedad global y sus consecuencias en las formas de vida y producción del pensamiento y de la vida cotidiana de la población, se hace inminente revisar y replantear el enfoque estratégico de un programa de control basado en los principios de ecosalud. Este debe sustentarse en los principios de la transdisciplinariedad, equidad social y de género, así como, la intersubjetividad de la transferencia del conocimiento (equipo salud y comunidades). Debe estar acompañado no solo del estudio de las condiciones climáticas y atmosféricas de cada región sino de un estudio de la ecología de la zona, y el comportamiento de los vectores y reservorios, así como las características demográficas y culturales de la población.

En el programa debe existir una legítima participación comunitaria y estar soportado en indicadores de gestión que viabilicen su ejecución, monitoreo y evaluación de las acciones facilitando de esta manera que los resultados de cada iniciativa puedan tener un escalamiento en otras áreas endémicas (Sánchez Torres y Sánchez, 2013).

El componente educativo en leishmaniasis visceral, se ha enfocado desde una comprensión integral humanista y transformadora de la realidad social en estudio, la cual pasa por dos escenarios vinculantes, uno, el análisis de la capacidad de respuesta de los actores institucionales, sus niveles de responsabilidad y compromiso relacionado con la gestión del programa integral de control de esta endemia. Esto debido, a

que entendemos que en gran medida, el éxito o fracaso de las iniciativas de educación y la participación comunitaria se asocia a la valoración del equipo de salud, a partir del análisis objetivo de sus debilidades y fortalezas, capacidades y potencialidades.

A partir de este referente teórico asociado a un nuevo enfoque ecosistémico de la educación y participación comunitaria, se vincula la construcción progresiva de la experiencia de un programa de control integral de L.V en el estado Nueva Esparta. Significa entonces, que desde la premisa, formar para transformar, sustentado en una metodología aprender/haciendo, se fue construyendo en forma participativa las condiciones para avanzar en la transferencia de los conocimientos científicos asociados a esta endemia, los cuales pasan por cada uno de sus componentes; clínico, epidemiológico, entomológico y la significación y contraste entre los saberes populares de la enfermedad y lo científico. Sustentado en una visión de la geoespacialidad, que como herramienta nos facilita la comprensión estratificada de la población de influencia en las zonas endémicas y sus características de vida integral.

Una vez capacitado integralmente al personal de salud ubicado en los Ambulatorios en zonas endémicas, se pasa al escenario del encuentro directo con la población sujeto/objeto del programa para generar en forma conjunta y responsable las iniciativas de educación y participación social, como estrategia que contribuye a la formación y conciencia crítica de la ciudadanía, y así contribuir a la transformación de los indicadores de calidad de vida y desarrollo social local. Resaltando en las poblaciones el reconocimiento de las capacidades y potencialidades en su dimensión socio-cultural-organizativa y sus formas de producción económica, articulada a los programas de prevención y control de la leishmaniasis visceral.

En nuestra experiencia en el marco de los proyectos de investigación financiados por el Ministerio de salud y la Universidad Central de Venezuela, FONACIT 2005, CDCH-UCV 2009, PEI 2012 y en correspondencia con las premisas planteadas, la programación se ha organizado en dos fases, la

primera orientada al fortalecimiento del equipo de salud (Figura 1) involucrado en la gestión del proyecto de Leishmaniasis visceral en el estado Nueva Esparta. Y la segunda fase, la transferencia directa de los conocimientos a las comunidades endémicas de influencia a los Ambulatorios.

La ejecución de la primera fase, se realizó a través del diseño y desarrollo de un ciclo de talleres, vinculado con el objetivo de fortalecimiento del conocimiento integral de la leishmaniasis visceral. Entre los talleres se mencionan: Actualización de los aspectos clínicos, epidemiológicos y de investigación en leishmaniasis visceral. Considerando el análisis comparativo entre los indicadores del comportamiento de la LV, internacional, nacional y especialmente la incidencia en el estado Nueva Esparta. Análisis de la comunicación eficaz, desde la valoración del significado del proceso humano y la vinculación con la identidad y compromiso del personal de salud que interactúa cotidianamente en las actividades educativas ante el control integral de la leishmaniasis visceral en las comunidades. Significando entonces, durante este taller, la esencia del ser humano como facilitador de los procesos educativos.



**Figura 1.** Taller Introducción a la Georreferencia comunitaria en el Marco del proyecto de Leishmaniasis Visceral.

### **Introducción a la Georreferencia Comunitaria en el marco del Proyecto de Leishmaniasis Visceral.**

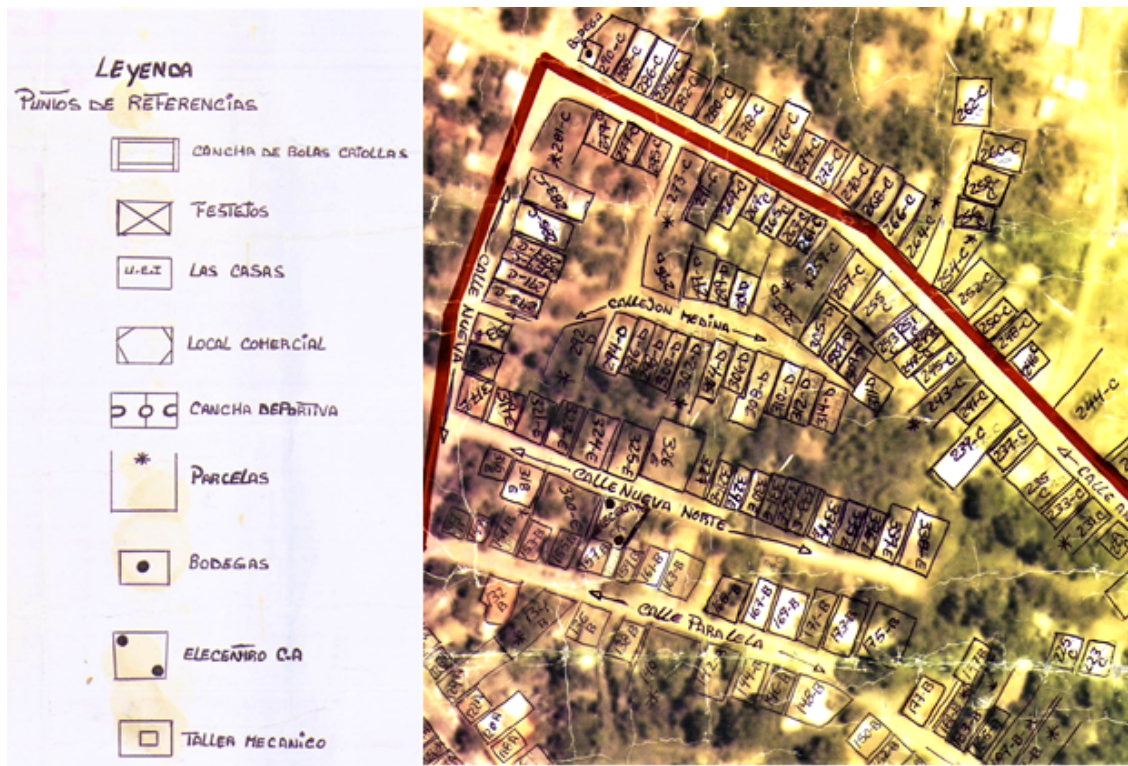
Su objetivo es explicar las bases conceptuales y metodológicas del uso de los sistemas de georreferencia,

como soporte del sistema de vigilancia epidemiológica con participación comunitaria en el marco del proyecto de LV. Entre los contenidos desarrollados: Descripción de los sistemas de georeferencia y su uso en los sistemas de vigilancia epidemiológica (SVE). Definir que es un sistema de información geográfica (SIG). Objetivos, funciones, componentes, y aplicaciones de los SIG (metodologías de integración a los SVE). Definir los principales indicadores referidos al SVE que son susceptibles de ser georeferenciados. Revisión de los mapas básicos (croquis) manejados usualmente por los equipos de salud local insumo primario para introducir el uso de Software Quantum GIS (Construcción de bases de datos, transferencia de datos de GPS a QGIS, visualización, estratificación de variables, construcción de gráficos y mapas). ¿Cómo se integra un SIG al SVE de LV? Presentación de un modelo de sistema de información geográfica orientado a la Web.

La segunda fase de la programación, relacionada al encuentro y transferencia de conocimientos a las comunidades endémicas, fue coordinada por el equipo de salud de Nueva Esparta, la Dirección de Zoonosis, La Dirección de Dermatología Sanitaria y la Dirección de Endemias Rurales con la realización de jornadas de despistaje serológico de LVC aunado a ciclos de talleres participativos con las comunidades y dinámicas con escolares de instituciones educativas municipales combinando los programas de control de leishmaniasis visceral y Dengue.

Durante esta segunda fase de transferencia de conocimientos a las comunidades endémicas, se integró la herramienta de la georeferencia aplicada al control de la LVC, (Figura 2), sustentada en una investigación exploratoria comunitaria, con el apoyo a una entrevista a personas claves (líderes comunitarios), la cual facilitó registrar una serie de datos a ser georeferenciados. Integrando el uso del mapa del estado Nueva Esparta, a los fines de identificar las comunidades endémicas, y sus respectivas coordenadas para visibilizar las facilidades de acceso a las mismas.

Se procedió a la identificación de las parcelas y tipo de viviendas, así como sus habitantes (censo comunitario). Identificación de los lugares de interés para la comunidad y el personal de salud, la ubicación



**Figura 2.** Georreferencia aplicada al Control de la LVC: Mapa sectorización en comunidad de la Guardia. Modificado por la comunidad

de los factores ambientales que forman parte de la eco-epidemiología de la enfermedad. Tipo y calidad de los servicios públicos, agua, electricidad, ubicación de desechos sólidos, entre otros, presencia de reservorios, cercanía a zonas agrestes, cuerpos de agua, tipos de vegetación, deforestación, temperatura, pluviosidad y otras variables.

Este registro de datos a georreferenciar en mapas temáticos, fueron coordinados por el personal de salud de cada Ambulatorio en conjunto con la comunidad, garantizando la apropiación de las técnicas de recolección de información en forma precisa, base para planificar, presentar propuestas, resolver problemas en el marco del programa de control integral de la LV en forma participativa y sustentable.

## DISCUSIÓN

Esta experiencia de un programa de control integral de la LV en comunidades endémicas del estado Nueva Esparta, desde un enfoque eco-sistémico de la educación y participación social sustentado en una

georeferencia, nos genera lecturas útiles y pertinentes a valorar metodológicamente para la continuidad de la misma en este mismo estado, o aplicación en otros estados endémicos del país.

En ese sentido, bajo el enfoque de “formar para transformar”, teniendo como metodología la de aprender/haciendo, se construye de forma progresiva y participativamente un modelo educativo. Donde se valora el fortalecimiento del conocimiento integral del comportamiento de la LV desde un contexto geoespacial y sociocultural, vinculado a un sistema de vigilancia epidemiológica comunitaria de la mencionada endemia. Significa entonces, que se abre un nuevo camino para alejarnos del modelo centralista y generalista de un programa de control de LV, para asumir en forma responsable y ética un compromiso coordinado entre las comunidades organizadas, y el personal de salud local. Obviamente, este cambio de enfoque requiere de un monitoreo permanente del equipo supervisorio por parte de la Dirección de Zoonosis y Epidemiología del estado. Donde necesariamente se trabajará desde el apoyo de indicadores para medir los cambios y los posibles escenarios, y como se puede modificar positivamente

estos indicadores del programa de control de la epidemia en forma progresiva y sostenible. Con un valor agregado que es la integración de un sistema de georreferenciación, la cual nos facilita la comprensión del problema desde una estratificación geoespacial expresada en mapas temáticos, recursos fundamentales para todo el proceso de gestión del programa.

## CONCLUSIONES

Entre las principales conclusiones de esta experiencia investigativa bajo el enfoque: aprender/haciendo, se visibiliza el valor del impacto significativamente positiva en su proceso de construcción de un nuevo modelo de estudio, la cual podemos definir como mixta/complementaria, pues articula aspectos clínicos, inmunológicos, epidemiológico y socioculturales sustentado en una plataforma geoespacial. A través de la tecnología de la georeferencia, se ha ido registrando el comportamiento espacial (mapas temáticos), de la presencia, distribución, e indicadores de condiciones generales de las formas de vida de la población involucrada en el estudio. Sin lugar a dudas, la evaluación de los indicadores de proceso nos aproximan a un cambio de actitud y de concepción del equipo en cuanto a la comprensión del problema en estudio, y además, se le suma indicadores de resultados, como la reducción en los datos de incidencia de la LV humana de 3.72 por 100.000 hab en 2006 a 0.22 en 2012 y la proporción de caninos positivos para LVC del 23% al 8% entre 2006 y 2015. (Programa Control Leishmaniasis, Biomedicina, MPPS/OPS, 2019).

Otra conclusión de esta experiencia válida de resaltar, desde el punto de vista de comprensión de este nuevo enfoque metodológico, en el marco de un programa de control integral de una epidemia, es la oportunidad de una articulación transdisciplinaria generando una aproximación de la comprensión de todas las variables que hacen vida en el mundo ecosistémico del comportamiento y alcances de esta epidemia. Estamos conscientes que aún el objetivo final del proyecto no se ha completado, el mismo se

encuentra en la valoración del proceso de construcción social y de salud, y esto significa, continuidad, responsabilidad, disciplina, ética y especialmente el compromiso de un trabajo en equipo, que lo podemos reflejar en: equipos de salud y comunidades. La continuidad de estos proyectos debe garantizarse a nivel institucional, proveyendo las condiciones adecuadas que permitan engranar todas las actividades de un programa de control, en el abordaje a las comunidades en zonas endémicas como son la búsqueda activa de casos, el diagnóstico oportuno y la formación de la comunidad en torno a la enfermedad. Por tanto, se puede sintetizar, que estamos ante un proyecto en proceso de construcción colectiva bajo un nuevo enfoque ontológico, epistemológico de la salud y el control integral de epidemias.

## REFERENCIAS

- BAZZANI R, WIESE M. (2012). "Poverty, Ecosystems, And Vector-Borne Diseases". En: CHARRON DF. "Ecohealth Research in Practice" Edited by International Development Research Centre (IDRC) Ottawa, Canada, pp 33-137.
- DAVID CV, CRAFT N. (2009). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis". *Dermatol Ther* 22:491-502.
- FELICIANGELI MD. (1991). "Vector of Leishmaniasis in Venezuela". *Parasitología*. 33 (1): 229-236.
- GARCIA GB. (2007). "Aporte de la etnografía en el conocimiento de los códigos socioculturales de la leishmaniasis cutánea localizada en un programa de educación para la salud, en Venezuela". *Cad Saúde Pública Rio de Janeiro* 23(1):S75-83.
- GARCIA GB, BORGES R. (2010). "Evaluación de conocimientos de la Leishmaniasis visceral en comunidades intervenidas con el programa de control. Municipios Díaz y Gómez -Isla de Margarita-del Estado Nueva Esparta. Venezuela". *Espacio Abierto Cuaderno Venezolano de Sociología* 19(1):79-92.
- INSTITUTO DE BIOMEDICINA. (2016, 2020). "Informe anual Programa de control Leishmaniasis". MPPS.
- LUGO DA, ORTEGA-MORENO ME, RODRÍGUEZ V, BELIZARIO DC, GALINDO WA, CABRERA-GONZÁLEZ M, ZERPA O, SÁNCHEZ MA. (2015). "Seroprevalencia de la leishmaniasis visceral canina mediante ELISA con rk39 en focos endémicos de Venezuela". *Revista Fac Cs Vet UCV* 56(1): 35-41.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. OPS OMS. (2019). "Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas". Washington, D.C. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/OPS-OMS-MPPS>.
- OPS-OMS-MPPS. (2019). "Programa de control de Leishmaniasis:

- Normas, pautas y procedimientos para el Diagnóstico y control". pp 196.
- ORTIZ RM, MUÑOZ S, LECHUGA D, DEL CAMPO M, TORRES E. (2003). "Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis visceral humana y canina en Venezuela". *Pan Amer J Pub Health* 13:1-2.
- PAHO-WHO. (2017). "Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022". PAHO-WHO.
- SÁNCHEZ MA, TAPIA FJ. (2005). "Inmunología de la Leishmaniasis Visceral Canina". *Bol de Mal y Sal Amb XLV*{2};11-18.
- SANCHEZ-TORRES MT, SANCHEZ MA. (2013). "Leishmaniasis canina en Venezuela, un problema de salud pública". *Talleres en Protozoología y Salud comunitaria* 16:61-73.
- WHO. (2010). "Control of the leishmaniases". *Technical report series N° 949*. Ginebra. pp 201.
- ZERPA O, ULRICH M, NEGRÓN E, RODRÍGUEZ N, CENTENO M, RODRÍGUEZ V, et. al. (2000). "Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela)". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(5):484-487.
- ZERPA O, ULRICH M, CONVIT J. (2003). "Programa Control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela". Caracas, Venezuela: Instituto de Biomedicina – MSDS –UCV.
- ZULUETA AM, VILLARROEL E, RODRÍGUEZ N, FELICIANGELI MD, MAZZARRI M, REYES O, (1999). "Epidemiologic aspects of American visceral Leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela". *Am J Trop Med Hyg* 61(6):945-50.

## AGRADECIMIENTOS

FONACIT G-2005000375-MS, PEII 2012000976, CDCH-UCV PSU-09-7878-2009. Sección Leishmaniasis Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit UCV-MPPS, Direcciones de Zoonosis, Dermatología Sanitaria y Endemias Rurales Edo Nueva Esparta.

# Viviendo dentro del enemigo: supervivencia de *Leishmania* en el interior de las células fagocíticas

Zelandia Fermín<sup>1</sup>

zelandiafermin@gmail.com

<https://orcid.org.0000-0001-5140-9007>

Ana Andreína Alviares<sup>1</sup>

anaalviares@gmail.com

Luis José Díaz<sup>1</sup>

ljdp0754@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina,  
Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

*Leishmania* es un género de protozoarios parásitos causantes en el hombre de un conjunto de enfermedades conocidas colectivamente como leishmaniasis. Estos organismos presentan dos estadios evolutivos; el promastigote, flagelado extracelular, que se encuentra dentro del intestino del insecto vector, y el amastigote, intracelular, no móvil, que parasita distintas células de mamíferos. El amastigote, sobrevive y se multiplica en el interior de vacuolas parasitóforas, dentro de los macrófagos y neutrófilos, apropiándose de sus nutrientes y evadiendo los mecanismos de destrucción de estas células inmunitarias. Para mantener la infección a largo plazo, *Leishmania* debe asegurar su supervivencia dentro del macrófago, su célula hospedadora principal, para lo cual se vale de numerosas estrategias tendientes a: (1) garantizar su entrada silenciosa a estas células, valiéndose en ocasiones de su paso encubierto dentro de los neutrófilos; (2) evitar su destrucción por metabolitos tóxicos y (3) prevenir la presentación de sus antígenos en la membrana celular, que alerten a los linfocitos Th1 y Tc de su presencia. Aunque se ha progresado mucho en la comprensión general de estos procesos, la completa identificación de las moléculas del parásito y del hospedador involucradas en esta contienda hospedador-parásito será crucial para el avance en el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas más efectivas contra las leishmaniasis.

**Palabras clave:** *Leishmania*; macrófago; neutrófilo; fagosoma

## LIVING WITHIN THE ENEMY: SURVIVAL OF *LEISHMANIA* INSIDE THE PHAGOCYtic CELLS

### ABSTRACT

*Leishmania* is a genus of protozoan parasites causing a group of diseases in humans collectively known as leishmaniasis. These organisms present two evolutionary stages; the promastigote, extracellular flagellate, found inside the intestine of the vector insect, and the amastigote, intracellular non-motile, that parasitizes

different mammalian cells. The amastigote survives and multiplies inside parasitophorous vacuoles, within macrophages and neutrophils, appropriating nutrients and evading the destruction mechanisms of these immune cells. To maintain the infection in the long term, *Leishmania* must assure its survival within the macrophage, its main host cell, for which it uses numerous strategies aimed to: (1) guarantee its silent entry into these cells, sometimes undercover within neutrophils, (2) avoid their destruction by toxic metabolites, (3) and prevent the presentation of its antigens on the cell membrane, which could alert Th1 and Tc lymphocytes of their presence. Although much progress has been made in the general understanding of these processes, the complete identification of the parasite and host molecules involved in this host-parasite contest will be crucial to attain progress in the development of more effective therapeutic and prophylactic strategies against leishmaniasis.

**Keywords:** *Leishmania*; macrophage; neutrophil; phagosome

## INTRODUCCIÓN

*Leishmania* es el nombre de un género de protozoarios parásitos causantes de un conjunto de enfermedades en el hombre denominadas colectivamente leishmaniasis. Estas patologías presentan un espectro de manifestaciones, que va desde formas cutáneas de variable grado de severidad (leishmaniasis cutánea: localizada, difusa, diseminada), a lesiones desfigurantes de la mucosa oro-naso-faríngea (leishmaniasis mucocutánea), o el grave compromiso de órganos internos (leishmaniasis visceral), generalmente mortal si no es atendida (WHO, 2010). La evolución y respuesta al tratamiento de estas enfermedades está influenciada tanto por la especie de parásito causante de la infección, como por el terreno genético del hospedador (condicionante de la respuesta inmunitaria) y su estado general de salud (Burza *et al.*, 2018). La malnutrición y la inmunosupresión, especialmente la causada por la infección por el virus de inmunodeficiencia humana, aumentan la susceptibilidad al desarrollo de

manifestaciones clínicas, y pueden conducir a lesiones en localizaciones atípicas (WHO, 2010).

Las leishmaniasis son endémicas en 102 países de áreas tropicales y sub-tropicales del planeta, donde 1,3 millones de personas se infectan cada año, entre 20.000 - 30.000 fallecen y más de 350 millones viven en riesgo de contraer la infección (OPS, 2019). La incidencia de esta parasitosis ha mostrado un importante aumento en las últimas décadas debido a múltiples factores, entre los que destacan: falla en las medidas de prevención y control, migraciones causadas por conflictos bélicos e inestabilidad política, calentamiento global, y el surgimiento de cepas de parásitos resistentes a los fármacos disponibles (WHO 2010; Berry *et al.*, 2016). La ausencia de una vacuna efectiva y las limitaciones asociadas a los pocos fármacos existentes para su tratamiento (vía de administración, toxicidad, desarrollo de resistencia) han dificultado el control de estas enfermedades lo cual hace prioritario el desarrollo de nuevos tratamientos (Burza *et al.*, 2018). Una mejor comprensión de los mecanismos empleados por *Leishmania* para subvertir las funciones básicas de sus células blanco en su beneficio, podría abrir importantes vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas o profilácticas novedosas. En este trabajo se revisan los avances logrados en esta área hasta la fecha.

### **Metaciclogénesis e invasión del hospedador vertebrado**

*Leishmania* presenta un ciclo de vida digenético; una parte de este ocurre en un insecto vector (género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomya* en el nuevo mundo) y la otra en el interior de células fagocíticas de organismos vertebrados susceptibles. En el insecto se desarrolla el estadio promastigote; elongado, de 20 a 30  $\mu\text{m}$  de longitud, con un flagelo largo que emerge de la parte anterior del cuerpo y le proporciona movilidad. El promastigote presenta dos morfotipos principales: el promastigote procíclico, forma proliferativa, no infectiva, localizada generalmente en el intestino medio, y el promastigote metacíclico, forma infectiva, no proliferativa, que se

localiza en el intestino anterior y la probóscide del insecto, y es transmitida al hospedador vertebrado a través de la picadura. En el hospedador mamífero se encuentra la forma amastigote, la cual es redondeada a ovoide, mide de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y no presenta flagelo aparente. Es intracelular obligatoria, pues vive y se multiplica en el interior de vacuolas parasitóforas dentro de las células blanco (OPS, 2019).

Cuando un insecto vector hembra infectado se alimenta de la sangre de un vertebrado, inocula en la dermis un pequeño número (10-200) de promastigotes metacíclicos presentes en su probóscide. En la piel, los promastigotes son internalizados por células fagocíticas, como: neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas; particularmente dentro de los macrófagos se transforman en amastigotes, y se multiplican en el interior de vacuolas parasitóforas, hasta hacerlos estallar. Los parásitos liberados infectan nuevas células o son ingeridos por un insecto vector (Kaye, 2011). *Leishmania* ha desarrollado una serie de mecanismos destinados a garantizar su supervivencia frente al sistema inmunitario del hospedador vertebrado; inicialmente, frente a los efectores solubles presentes en el plasma, y más tarde, contra aquellos que amenazan su permanencia en el interior de las células fagocíticas.

### **Supervivencia frente a la eliminación por el sistema del complemento**

Cuando el insecto vector deposita los parásitos en la epidermis del hospedador mamífero ocurren eventos importantes para el establecimiento de la infección. Los promastigotes desencadenan inmediatamente la activación del sistema de complemento y la deposición del factor C3 en su superficie, lo que permite el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (C5b-C9), dando como resultado la lisis de cerca de 90% de los parásitos durante los primeros minutos de la infección (Domínguez *et al.*, 2003). La resistencia de los promastigotes restantes a la destrucción es causada por cambios estructurales en la molécula de membrana lipofosfoglicano (LPG), ocurridos durante su diferenciación a promastigotes metacíclicos, que

les proporciona un glicocáliz más grueso, prácticamente impenetrable para el complejo de ataque de membrana (Puentes *et al.*, 1990). Por otra parte, los promastigotes metacíclicos poseen una ectoquinasa, que fosforila a los factores C3, C5 y C9 causando su inactivación (Hermoso *et al.*, 1991), y expresan en su superficie la glicoproteína gp63, una proteasa que escinde al factor C3b, generando el péptido inactivo iC3b, que además de abortar la activación del sistema, promueve la internalización del parásito por las células fagocíticas al ser reconocido como opsonina por el receptor CR3 (Brittingham *et al.*, 1996). Irónicamente, la activación del complemento facilita a los promastigotes metacíclicos sobrevivientes invadir las células fagocíticas y sobrevivir en su interior (Sacks y Sher, 2002).

### **EVASIÓN DE LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS**

#### **Macrófagos**

Aunque *Leishmania* tiene la capacidad de infectar distintos tipos celulares (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, queratinocitos y fibroblastos) el macrófago constituye su célula blanco predilecta y principal responsable del mantenimiento de la infección (Kaye *et al.*, 2011). Una elección que presenta grandes desafíos, ya que esta poderosa célula de la inmunidad innata, además de tener la potencialidad de desplegar una potente actividad microbicida, posee la capacidad de presentar sus antígenos a los linfocitos T y alertarlos sobre su presencia. De modo que la supervivencia del parásito dependerá del equilibrio entre la capacidad del macrófago para activarse y la habilidad del parásito para evitar que esto ocurra.

Los promastigotes de *Leishmania* interactúan con el macrófago en varias etapas, comenzando por la adhesión, que involucra el reconocimiento, tanto de ligandos intrínsecos del parásito (lipofosfoglicano y gp63), como de opsoninas depositadas en su superficie (complemento, anticuerpos naturales), por receptores específicos; entre ellos: los receptores de

complemento CR1 y CR3, el receptor de fibronectina, el receptor de manosa y los receptores de IgG (Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII) (Ueno *et al.*, 2012). Posteriormente, el parásito es internalizado mediante el proceso de fagocitosis, dependiente principalmente de las GTPasas Rac-1 y Arf6 (Lodge y Descoteaux, 2006; Moradin y Descoteaux, 2012). La membrana plasmática del macrófago lo envuelve, hasta incorporarlo en un compartimento especializado llamado fagosoma, el cual evoluciona hasta convertirse en una vacuola parasitófora. La vacuola parasitófora es un compartimento híbrido, de composición dinámica, que si bien se origina a partir del sistema endocítico de la célula hospedadora, es modificado en el tiempo por la incorporación de componentes del parásito y de la vía de secreción (retículo endoplasmático-Golgi) (Ndjamen *et al.*, 2010; Young y Kima, 2019). Como consecuencia, en distintas etapas, se pueden encontrar en la membrana vacuolar moléculas asociadas a la membrana de lisosomas, como las proteínas LAMP1, LAMP2 y la bomba de protones vacuolar V-ATPasa; y pertenecientes al sistema de secreción, como calnexina y Sec22b. Además, se han identificado en estos organelos: moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), la sub-unidad gp91phox del complejo nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa, macrosialina, así como las proteasas solubles catepsina B, D, H, L, y otras hidrolasas lisosomales (Young y Kima, 2019). En esta estructura, *Leishmania* inicia su transformación de la forma promastigote a amastigote, un proceso desencadenado por el aumento de la temperatura, la disminución del pH y la disminución de la disponibilidad de hierro (Mittra *et al.*, 2013).

Dentro de las primeras horas, dependiendo de la especie, el promastigote pierde su flagelo y adopta una forma ovoide y reducida, pudiéndose registrar la expresión de genes específicos de la forma amastigote (de Pablos *et al.*, 2016). La reducción de tamaño que tiene lugar durante la transformación está asociada a un proceso de invaginación masiva del complejo membrana plasmática-citoesqueleto, similar a lo

observado en los procesos autofágicos de eucariotas superiores (Dagger *et al.*, 2017).

Luego de la internalización de la mayoría de los microorganismos, los fagosomas de los macrófagos sufren un proceso de maduración, en el que adquieren propiedades microbicidas al fusionarse con lisosomas y endosomas, bajo regulación de las GTPasas Rab5 y Rab7, convirtiéndose en fagolisosomas (Kaye y Scott, 2011). Durante este proceso, tiene lugar la acidificación progresiva del organelo, debido a la incorporación a su membrana de la bomba de protones vacuolar y la adquisición de enzimas lisosomales (Podinovskaia y Descoteaux, 2015). Por otra parte, los macrófagos producen una variedad de compuestos tóxicos que ayudan a destruir al microorganismo fagocitado, entre ellos: péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno. El complejo multicomponente NADPH oxidasa se ensambla en la membrana del fagosoma e inicia un proceso conocido como “estallido respiratorio”, en el que se produce el ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a partir de oxígeno molecular. Posteriormente, la enzima superóxido dismutasa convierte el O<sub>2</sub><sup>-</sup> en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y en una serie de reacciones adicionales se producen a partir de este último un conjunto de sustancias tóxicas, entre ellas los radicales hidroxilo (OH), hipoclorito (OCl<sup>-</sup>) e hipobromito (OBr<sup>-</sup>) (Nauseef *et al.*, 2008). Por otra parte, se inicia la expresión en la membrana vacuolar de la enzima sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS o NOS2), la cual cataliza la producción de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina (Miller *et al.*, 2004). De forma tal que, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir a las condiciones adversas dentro de los fagolisosomas de los macrófagos.

Numerosos trabajos han demostrado que la acidificación que se presenta típicamente al transformarse el fagosoma inicial en fagolisosoma, es inhibida transitoriamente en aquellos que contienen promastigotes vivos de *Leishmania* (Kaye y Scott, 2011). El lipofosfoglicano, un componente de la membrana celular del parásito, de expresión

abundante en la superficie del promastigote y moderada o ausente en el amastigote, ha sido identificado como el principal responsable de alterar el tráfico intracelular y la biogénesis del fagolisosoma (Turco y Sacks, 1991; Moradin y Descoteaux, 2012). Este glicofosfolípido ocasiona la acumulación de F-actina en la periferia del fagosoma, lo que interfiere con la maduración al modificar la estructura de los microdominios lipídicos de la membrana involucrados en distintas vías de señalización (Lodge *et al.*, 2006; Moradin y Descoteaux, 2012). También se ha demostrado la participación de la metaloproteasa gp63 mediante la inactivación proteolítica del SNARE VAMP8, parte de la maquinaria responsable de la fusión de organelos (Matheoud *et al.*, 2013). De esta manera, son excluidas la NADPH oxidasa, la bomba de protones y las hidrolasas ácidas lisosomales el tiempo necesario para que ocurra la diferenciación del promastigote a la forma amastigote, mejor adaptada para la supervivencia en el fagolisosoma (Matheoud *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2014). Las características de las vacuolas formadas durante la internalización de los amastigotes son distintas a las de los promastigotes; en el caso de las vacuolas de amastigotes, ocurre libremente la fusión de los lisosomas con la vacuola parasitófora, ya que estos no se ven afectados por las enzimas lisosomales (Moradin y Descoteaux, 2012; Podinovskaia y Descoteaux, 2015). El hecho de que la forma amastigote resida dentro de un ambiente ácido en la vacuola parasitófora, es consistente con el pH óptimo al cual se llevan a cabo muchos de sus procesos metabólicos (pH 4 – 5,5), como: respiración, catabolismo de sustratos energéticos e incorporación de precursores en macromoléculas, a diferencia de las condiciones de pH neutro requeridas por la forma promastigote (Moradin y Descoteaux, 2012). Sin embargo, tanto el promastigote como el amastigote evitan la exposición a oxidantes, lo cual consiguen a través de la inhibición del ensamblaje de la NADPH oxidasa responsable de su síntesis (Ueno y Wilson, 2012; Moradin y Descoteaux, 2012), proceso en el cual participa además del LPG, la proteína gp63 (Yao *et al.*, 2003).

El desarrollo funcional de los fagosomas es influenciado por los receptores que desencadenan su formación; la internalización de *Leishmania* mediante los receptores CR3 y CR1, inhibe la inflamación, el estallido respiratorio y la acumulación de marcadores lisosomales, creando condiciones “inmunológicamente silenciosas” más favorables para su supervivencia, mientras que la fagocitosis mediada por los FcR conduce a una mayor activación de la NADPH-oxidasa en el recién formado fagosoma (Ueno *et al.*, 2012). Sin embargo, el destino final de la vida intracelular de *Leishmania* dentro del macrófago es determinado por la vía que este tome en el metabolismo de la L-arginina, aminoácido de gran importancia en la regulación de un importante mecanismo efector de los macrófagos. La L-arginina puede ser catabolizada por la enzima iNOS2 para producir NO, o por la arginasa para la síntesis de poliaminas, dependiendo del estímulo de activación. Cuando los macrófagos son expuestos a citoquinas de tipo Th1, como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o al lipopolisacárido (LPS), ligando del receptor tipo Toll 4 (TLR4), la expresión de la iNOS es sobre-regulada, conduciendo al metabolismo de la arginina hacia la producción de NO, principal molécula leishmanicida del macrófago (Green *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1991). En cambio, las citoquinas de tipo Th2, como la interleuquina (IL)-4, la IL-10, la IL-13 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), inducen preferiblemente la utilización de la L-arginina para la producción de poliaminas, las cuales son importantes nutrientes requeridos por *Leishmania* para su proliferación (Iniesta *et al.*, 2002; Barksdale *et al.*, 2004; Kane *et al.*, 2001). Estos estados de activación del macrófago, han sido denominados, respectivamente, M1 o “activados de manera clásica” y M2 o “activados de manera alternativa”, y conducen a desenlaces divergentes de la infección (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). La estrategia asumida por *Leishmania* para su supervivencia en este caso ha sido la regulación de la producción de las citoquinas inductoras del fenotipo M1 por las células dendríticas y linfocitos Th1 o el bloqueo de las vías de señalización de sus

receptores en el macrófago. Luego del establecimiento de la vacuola parasitófora, el macrófago es capaz de cargar ciertos antígenos parasitarios en moléculas del MHC-II. Sin embargo, los amastigotes de *Leishmania* interfieren con el transporte de estas moléculas a la membrana celular, manteniéndolas retenidas en la membrana vacuolar (Antoine *et al.*, 1998), a la vez que las internaliza y degrada dentro de sus megasomas (Antoine *et al.*, 1999). Por otra parte, ha sido demostrado que la invasión silenciosa de los macrófagos por *L. major*, mediada por CR3, conduce al bloqueo selectivo de la cascada de señalización de la IL-12, interfiriendo de esta manera con las señales requeridas para la diferenciación funcional de los linfocitos al fenotipo protector Th1 (Carrera *et al.*, 1996; Sacks y Noben-Trauth, 2002). Por último, factores producidos por *Leishmania* bloquean en distintos puntos las vías de transducción del receptor del IFN- $\gamma$  en el macrófago (Kima *et al.*, 2007), impidiendo de esta manera que el macrófago pueda ser reconocido y activado por los linfocitos Th1.

Existe una diferencia evidente en la morfología de las vacuolas parasitóforas entre distintas especies de *Leishmania*; *L. mexicana* y *L. amazonensis*, por ejemplo, residen en grandes vacuolas comunales que ocupan una gran proporción del volumen de la célula hospedadora, mientras que otras especies, como *L. major*, *L. donovani* y *L. infantum*, lo hacen en pequeñas vacuolas individuales (Alexander *et al.*, 1999). Si bien, ha sido sugerido que un tamaño mayor de vacuola sería beneficioso para la dilución de metabolitos tóxicos, aún no ha sido posible establecer de manera definitiva las ventajas que confieren a cada grupo estos comportamientos opuestos para su supervivencia.

### Neutrófilos

Los neutrófilos desempeñan un importante, aunque no completamente comprendido, rol en la infección por *Leishmania*. Son las primeras células fagocíticas en migrar rápida y masivamente al sitio de la inoculación, siendo detectadas a partir de los 30 segundos en lesiones experimentales, pero también se observan

tardíamente en lesiones crónicas (Peters *et al.*, 2008). Los neutrófilos son reconocidos por su función antimicrobiana, desempeñando un rol decisivo en la respuesta inmunitaria innata del hospedador (Nauseef, 2014). Durante la fagocitosis, facilitada por opsoninas, extienden pseudópodos que recubren a los microorganismos y los encierran en un fagosoma, el cual se transforma en un fagolisosoma al fusionarse con diferentes gránulos citoplasmáticos (Nauseef, 2014): los primarios o azurófilos, que contienen mieloperoxidasa, defensinas, lisozimas, arginasa I, elastasas y captasinas G; los secundarios o específicos, que contienen lisozimas, lactoferrina, colagenasa y gelatinasa; los terciarios, que contienen gelatinasa y metaloproteinasas de matriz, y las vesículas secretoras (Borregaard *et al.*, 2007). Adicional a esto, ensamblan el complejo NADPH oxidasa en la membrana del fagolisosoma, y producen ROS (Nauseef *et al.*, 2008); este mecanismo en conjunto con la mieloperoxidasa, contenida en los gránulos azurófilos, cataliza la formación de ácido hipocloroso que desempeña un rol crítico en la destrucción de patógenos de forma directa o indirecta (Mayadas *et al.*, 2014). Los neutrófilos, además, pueden producir NO, gracias a la enzima iNOS expresada en sus gránulos azurófilos (Evans *et al.*, 1996). Las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) son un mecanismo microbicida descrito más recientemente en estas células, que consiste en la extrusión de mallas de cromatina, entrelazadas con proteínas de origen nuclear y granular, que inmovilizan microorganismos extracelularmente facilitando su destrucción (Brinkmann *et al.*, 2004). Este proceso ha sido asociado a vías independientes o dependientes de la producción de ROS, así como a la liberación de ADN nuclear o mitocondrial (Nauseef, 2014; Sorensen y Borregaard, 2016).

En 1981, Chang demostró por primera vez la capacidad leishmanicida de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) de hámsters, sobre amastigotes de *L. donovani*. En este trabajo observó la fusión de lisosomas a los fagosomas que contenían los parásitos y detectó la producción de ROS en ellos (Chang *et al.*, 1981). El mismo año se demostró mediante microscopía

electrónica la destrucción intracelular de promastigotes de *L. donovani* por PMN humanos, lo cual fue relacionado con la activación del estallido respiratorio, ya que los PMN de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica eran incapaces de eliminar al parásito (Pearson y Steigbigel, 1981). En ambos casos se infirió un rol protector de estas células, sin embargo, ha sido demostrado que *Leishmania* es capaz de resistir las funciones microbicidas de los neutrófilos mediante distintas estrategias (Regli *et al.*, 2017). *L. major* y *L. donovani* permiten la fusión de los gránulos azurófilos, pero previenen la fusión de los gránulos específicos y de gelatinasa, que contienen la bomba V-ATPasa y el citocromo b. De esta manera evitan la acidificación del fagosoma y la activación de la NADPH oxidasa, con lo cual reducen la acción de las hidrolasas ácidas y las mieloperoxidasas presentes en los gránulos azurófilos (Mollinedo *et al.*, 2010). La forma amastigote de *L. braziliensis* induce la producción de altos niveles de ROS tanto por neutrófilos humanos como murinos, pero estos no afectan su viabilidad (Carlsen *et al.*, 2015; Falcao *et al.*, 2015). Se desconoce el mecanismo específico en cada caso, pero ha sido demostrado que el LPG y la proteína gp63 poseen un efecto inhibitorio sobre el estallido respiratorio de neutrófilos humanos (Brandonisio *et al.*, 1994; Sørensen *et al.*, 1994), y los promastigotes de *L. donovani* expresan una fosfatasa ácida, en su superficie externa, capaz de inhibir la producción de aniones superóxido por los neutrófilos humanos (Remaley *et al.*, 1984). La destrucción por los agentes microbicidas de los neutrófilos, parece ser, como en el caso de los macrófagos, estadio-específica, ya que los promastigotes, pero no los amastigotes, de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* son destruídos intracelularmente por su efecto (Carlsen *et al.*, 2013). Por otra parte, la arginasa I presente en los gránulos azurófilos interfiere con la producción de NO por la iNOS al competir por la L-arginina, sustrato común de ambas enzimas, promoviendo así la supervivencia de los parásitos (Gotoh y Mori, 1999; Iniesta *et al.*, 2001). Aunado a esto, ha sido descrito en el caso de *L. donovani* el traslado de entre 20-25% de los

promastigotes fagocitados a compartimientos no líticos, lo que sugiere la existencia de otras estrategias de evasión menos conocidas (Gueirard *et al.*, 2008). La eficacia de las trampas extracelulares de neutrófilos o NETs contra *Leishmania* depende de la especie del parásito. Las NETs, son un eficaz mecanismo microbicida contra *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009), pero otras especies han desarrollado variados mecanismos para lograr evadirlas promoviendo su supervivencia; *L. donovani* puede resistir la actividad microbicida de las NETs por el grueso glicocálix que forma su LPG (Gabriel *et al.*, 2010); *L. infantum* es capaz de degradar la estructura de ADN de las NETs mediante la enzima de superficie 3'nucleotidasa/nucleasa (Guimarães-Costa *et al.*, 2014), y tanto *L. infantum* como *L. major* inhiben la producción de las NETs dependientes de ROS al interferir con la producción de estos metabolitos (Guimarães-Costa *et al.*, 2014; Salei *et al.*, 2017). Las observaciones hasta la fecha sugieren que el desenlace de la interacción entre distintas especies de *Leishmania* y los neutrófilos es diverso, y en algunos casos contradictorio.

Los neutrófilos son células de vida media muy corta y ha sido propuesto que *Leishmania* es capaz de alterar su tiempo de vida, ya sea estimulando o inhibiendo la apoptosis de estas células, en su beneficio. Las observaciones hasta la fecha han sido muy variables y parecen depender de la especie del parásito, de la especie del hospedador y del origen de las células. *Leishmania mexicana* no influencia la apoptosis de neutrófilos dérmicos *ex vivo* (Hurrell *et al.*, 2015) y *L. infantum* no induce la apoptosis de los neutrófilos *in vitro* (Marques *et al.*, 2015). Por el contrario, *L. braziliensis* induce la apoptosis de neutrófilos *in vitro* (Falcao *et al.*, 2015), y *L. major* induce la apoptosis de los neutrófilos en la dermis (Peters *et al.*, 2008), pero retrasa la de los neutrófilos derivados de sangre periférica (Sarkar *et al.*, 2013). El efecto anti-apoptótico de *Leishmania major* ha sido asociado al incremento sostenido de las moléculas Bcl-2 and Bfl-1, y de la expresión de FAS, por lo que la infección afecta tanto la vía intrínseca,

como extrínseca de inducción de la apoptosis (Sarkar *et al.*, 2013).

En el año 2004, se demostró que los macrófagos fagocitan ávidamente neutrófilos apoptóticos infectados con *Leishmania major*. Esta forma de internalización induce producción de TGF- $\beta$ , lo que modula sus funciones microbicidas, favoreciendo la supervivencia del parásito. Esto llevó a proponer que *Leishmania* podría emplear a los PMN como un "caballo de Troya" para ingresar de manera silenciosa a los macrófagos, sus células hospedadoras definitivas, sin ser eliminados (van Zandbergen *et al.*, 2004). Esta observación hizo pensar que *Leishmania* solo usaba al neutrófilo como un refugio transitorio para ganar acceso a su célula blanco definitiva, sin embargo, recientemente se demostró que amastigotes de *L. mexicana* son capaces de replicarse dentro de los fagolisosomas de neutrófilos, lo cual sugiere un rol más activo de este tipo celular en el desarrollo crónico de la enfermedad (Hurrell *et al.*, 2017).

Por último, el subconjunto de neutrófilos con el que interactúan los parásitos puede afectar la respuesta inmune adaptativa; por ejemplo: la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos infectados por las células dendríticas perjudica su maduración y el desarrollo de una respuesta eficiente (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012), y la fagocitosis de neutrófilos de baja densidad induce la expresión de altos niveles de PDL1, un marcador que promueve el agotamiento de las células T (Sharma *et al.*, 2016). Las evidencias acumuladas hasta la fecha muestran que el desenlace de la internalización de *Leishmania* por los neutrófilos es muy variable, ya que depende de la especie del parásito, de la forma evolutiva y de la sub-población de neutrófilos.

La evidencia apunta a un rol complejo de los neutrófilos en la infección por *Leishmania*, pudiendo en ocasiones destruir eficientemente al parásito, pero en otras ser manipulado por este para servirle de camuflaje en su entrada silenciosa a otras células, o de refugio seguro el tiempo suficiente para permitir su proliferación. Se debe ser cuidadoso en la interpretación de los resultados observados, ya que estas células han mostrado ser una población más heterogénea

de lo que se pensaba (Pillai *et al.*, 2012), por lo que la identificación de marcadores de subpoblaciones permitirá comparar de manera más clara los resultados obtenidos por distintos grupos frente a *Leishmania*.

## OBSERVACIONES FINALES

De lo descrito anteriormente, se concluye que para mantener la infección a largo plazo, *Leishmania* debe asegurar su supervivencia dentro del macrófago, su célula hospedadora principal, para lo cual se vale de numerosas estrategias tendientes a: garantizar su entrada silenciosa a estas células (valiéndose en ocasiones de su paso encubierto dentro de los neutrófilos), evitar su destrucción por metabolitos tóxicos y prevenir la presentación de sus antígenos en la membrana celular, que alerten a los linfocitos T de su presencia. Un tercer tipo celular importante en la orquestación del desenlace de la respuesta inmunitaria del hospedador frente a *Leishmania* son las células dendríticas. Estas células fagocíticas/pinocíticas, a diferencia de los macrófagos y neutrófilos, logran internalizar distintas especies del parásito, pero no parecen ser capaces de destruirlo, ni de apoyar su proliferación intracelular (von Stebut y Tenzer, 2018). Sin embargo, ha sido evidenciada la presencia en los ganglios linfáticos de ratones infectados, de células dendríticas portadoras de amastigotes en su interior mucho tiempo después de la cura clínica, por lo que se ha propuesto que actuarían como reservorio de la infección (Moll *et al.*, 1995). Por su capacidad excepcional para presentar antígenos, activar a los linfocitos T vírgenes y dirigir su diferenciación funcional, las células dendríticas son consideradas el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Varias especies de *Leishmania* emplean estrategias para atenuar la presentación de sus antígenos por estas células luego de su internalización. Pese a esto, en individuos infectados se observan sub-poblaciones de células dendríticas que conservan el control de su maquinaria de presentación de antígenos (probablemente aquellas que han capturado antígenos libres del parásito), lo que explica la generación de linfocitos T

específicos, tanto cooperadores como citotóxicos y supresores, durante la infección (Tiburcio *et al.*, 2019). Sin embargo, el estado funcional de las células dendríticas no escapa de la modulación por el microambiente de citoquinas y quimiocinas propiciado por el parásito, el cual determina su capacidad de activar o no a los macrófagos para la destrucción intracelular del parásito (Sacks y Noben-Trauth, 2002; Tiburcio *et al.*, 2019). Lamentablemente, la gran heterogeneidad, tanto ontogénica como funcional, de esta familia de células ha dificultado armonizar los datos, muchas veces contradictorios, obtenidos por los distintos grupos de investigación (Collin *et al.*, 2018; Tiburcio *et al.*, 2019). La identificación reciente de marcadores moleculares de los distintos sub-grupos de células dendríticas podría contribuir al avance en este sentido (Rhodes *et al.*, 2019; Patente *et al.*, 2019).

Por otra parte, es importante considerar que el amastigote, como parásito intracelular obligatorio, requiere garantizar la provisión de nutrientes necesarios para su desarrollo y replicación dentro de la vacuola parasitófora, para ello recurre al secuestro de los sistemas empleados por la célula hospedadora para su incorporación o generación (Podinovskaia *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2019). El establecimiento de *Leishmania* en el hospedador dependerá, por tanto, no solo del éxito de sus mecanismos para evadir la destrucción intracelular, sino de aquellos que le permitan apropiarse de los recursos nutricionales de la célula hospedadora. Aunque se ha progresado mucho en la comprensión general de estos procesos, la completa identificación de las moléculas del parásito y el hospedador involucradas en esta contienda hospedador-parásito será crucial para avance en el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas más efectivas contra las leishmaniasis. En este sentido, debido al rápido surgimiento de cepas de *Leishmania* resistentes a los fármacos, ha sido propuesta una nueva aproximación para el diseño de fármacos, basada en la intervención sobre blancos moleculares del hospedador involucrados en la interacción con parásito, mucho

más estables desde el punto de vista evolutivo que los del parásito (Lamotte *et al.*, 2017).

## REFERENCIAS

- ANTOINE J.C., LANG T., PRINA E., COURRET N., HELLIO R. (1999). "H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*". *Journal of Cell Science* 112:2559–2570.
- ANTOINE J.C., PRINA E., LANG T., COURRET N. (1998). "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages". *Trends in Microbiology* 6:392–401.
- BARKSDALE A.R., BERNARD A.C., MALEY M.E., GELLIN G.L., KEARNEY P.A., BOULANGER B.R., TSUEI B.J., OCHOA J.B. (2004). "Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol". *Surgery* 135:527–35.
- BERRY I., BERRANG-FORD L. (2016). "Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis". *Social Science & Medicine* 167:140–149.
- BORREGAARD N., SORENSEN O.E., THEILGAARD-MONCH K. (2007). "Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins". *Trends in Immunology* 28:340–5.
- BRANDONISIO O. PANARO M., MARZIO R., MARANGI A., FALIERO S., JIRILLO E. (1994). "Impairment of the human phagocyte oxidative responses caused by *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG): In vitro studies". *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 8:57–62.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria". *Science* 303:1532–1535.
- BRITTINGHAM A., MOSSER DM. (1996). "Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes". *Parasitology Today* 12:444–447.
- BURZA S., CROFT S.L., BOELAERT M. (2018). "Leishmaniasis". *Lancet* 392:951–970.
- CARRERA L., GAZZINELLI R.T., BADOLATO R., HIENY S., MULLER W., KUHN R., SACKS D.L. (1996). "*Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice". *Journal of Experimental Medicine* 183:515–26.

- CARLSEN E.D., HAY C., HENARD C.A., POPOV V., GARG N.J., SOONG L. (2013). "Leishmania amazonensis amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms". *Infection and Immunity* 81:3966–74.
- CARLSEN E., JIE Z., LIANG Y., HENARD C., HAY C., SUN J., DE MATOS GUEDES H., SOONG L. (2015). "Interactions between neutrophils and Leishmania braziliensis amastigotes facilitate cell activation and parasite clearance". *Journal of Innate Immunity* 7:354–363.
- CHANG K. (1981). "Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:322–33.
- COLLIN M., BIGLEY V. (2018). "Human dendritic cell subsets: an update". *Immunology* 154:3–20.
- DAGGER F., BENGIO C., MARTINEZ A., AYESTA C. (2018). "Leishmania mexicana differentiation involves a selective plasma membrane autophagic-like process". *Cell Stress and Chaperones* 23:783–789.
- DE PABLOS L.M., FERREIRA T.R., WALRAD P.B. (2016). "Developmental differentiation in Leishmania lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra". *Current Opinion in Microbiology* 34:82–89.
- DOMÍNGUEZ M., MORENO I., AIZPURUA C., TORAÑO A. (2003). "Early mechanisms of Leishmania infection in human blood". *Microbes and Infection* 5:507–513.
- EVANS T., BUTTERY L., CARPENTER A., SPRINGALL D., POLAK J., COHEN J. (1996). "Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:9553–9558.
- FALCÃO S.A., WEINKOPFF T., HURRELL B.P., CELES F.S., CURVELO R.P., PRATES D.B., BARRAL A., BORGES V.M., TACCHINI-COTTIER F., DE OLIVEIRA C.I. (2015). "Exposure to Leishmania braziliensis triggers neutrophil activation and apoptosis". *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9:e0003601.
- FEIJÓ D., TIBÚRCIO R., AMPUERO M., BRODSKYN C., TAVARES N. (2016). "Dendritic Cells and Leishmania Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease". *Journal of Immunology Research* 2016:3967436.
- GABRIEL C., MCMASTER W., GIRARD D., DESCOTEAUX A. (2019). "Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps". *Journal of Immunology* 185:4319–27.
- GOTOH T., MORI M. (1999). "Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents no-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells". *Journal of Cell Biology* 144:427–434.
- GREEN S.J., CRAWFORD R.M., HOCKMEYER J.T., MELTZER M.S., NACY C.A. (1990). "Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha". *Journal of Immunology* 145:4290–7.
- GUEIRARD P., LAPLANTE A., RONDEA C., MILON G., DESJARDINS M. (2008). "Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages". *Cellular Microbiology* 10:100–111.
- GUIMARÃES-COSTA A., NASCIMENTO M., FROMENT G., SOARES R., MORGADO F., CONCEIÇÃO F., SARAIVA E. (2009). "Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:6748–6753.
- GUIMARÃES A., DE SOUZA T., PALETTA R., FREITAS A., MEYER J., SARAIVA E. (2014). "3'-nucleotidase/nuclease activity allows Leishmania parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps". *Infection and Immunity* 82:1732–40.
- HERMOSO T., FISHELSON Z., BECKER S.I., HIRSCHBERG K., JAFFE C.L. (1991). "Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system". *EMBO Journal* 10:4061–4067.
- HURRELL B.P., BEAUMANN M., HEYDE S., REGLI I.B., MÜLLER A.J., TACCHINI-COTTIER F. (2017). "Frontline Science: Leishmania mexicana amastigotes can replicate within neutrophils". *Journal of Leukocyte Biology* 102:1187–1198.
- HURRELL B.P., SCHUSTER S., GRUN E., COUTAZ M., WILLIAMS R.A., HELD W., MALISSEN B., MALISSEN M., YOUSEFI S., SIMON H.U., MÜLLER A.J., TACCHINI-COTTIER F. (2015). "Rapid sequestration of Leishmania mexicana by neutrophils contributes to the development of chronic lesion". *PLOS Pathogens* 11:e1004929.
- INIESTA V., GÓMEZ-NIETO L., CORRALIZA I. (2001). "The inhibition of arginase by N (omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages". *Journal of Experimental Medicine* 193:777–784.
- INIESTA V., GOMEZ-NIETO L.C., MOLANO I., MOHEDANO A., CARCELEN J., MIRON C., ALONSO C., CORRALIZA I. (2002). "Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites". *Parasite Immunology* 24:113–8.

- KAYE P., SCOTT P. (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface". *Nature Reviews in Microbiology* 9:604-615.
- LAMOTTE S., SPÄTH G.F., RACHIDI N., PRINA E. (2017). "The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery". *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005480.
- LIEW F.Y., LI Y., MOSS D., PARKINSON C., ROGERS M.V., MONCADA S. (1991). "Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages". *European Journal of Immunology* 21:3009-3014.
- LODGE R., DESCOTEAUX A. (2006). "Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is *Rac1* dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation". *European Journal of Immunology* 36:2735-2744.
- LODGE R., DIALLO T.O., DESCOTEAUX A. (2006). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane". *Cellular Microbiology* 8:1922-1931.
- MARQUES C.S., PASSERO L.F., VALE-GATO I., RODRIGUES A., RODRIGUES O.R., MARTINS C., CORREIA I., TOMÁS A.M., ALEXANDRE-PIRES G, FERRONHA MH, SANTOS-GOMES GM. (2015). "New insights into neutrophil and *Leishmania infantum* in vitro immune interactions". *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 40:19-29.
- MATHEOUD D., MORADIN N., BELLEMARE-PELLETIER A., SHIO M.T., HONG W.J. OLIVIER M., GAGNON E., DESJARDINS M., DESCOTEAUX D. (2013). "*Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8". *Cell Host & Microbe* 14:15-25.
- MAYADAS T., CULLERE X., LOWELL C. (2014). "The multifaceted functions of neutrophils". *Annual Review of Pathology* 9:181-218.
- MILLER B.H., FRATTI R.A., POSCHET J.F., TIMMINS G.S., MASTER S.S., BURGOS M., MARLETTA M.A., DERETIC V. (2004). "Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection". *Infection and Immunity* 72:2872-2878.
- MITTRA B., ANDREWS N.W. (2013). "IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation". *Trends in Parasitology* 29:489-496.
- MOLL H., FLOHÉ S., RÖLLINGHOFF M. (1995). "Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response". *European Journal of Immunology* 25:693-699.
- MOLLINEDO F., JANSSEN H., DE LA IGLESIA J., VILLA J., CALAFAT J. (2010). "Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils". *Journal of Biological Chemistry* 285:34528-34536.
- MORADIN N., DESCOTEAUX A. (2012). "*Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:121.
- NAUSEEF W.M. (2008). "Biological roles for the NOX family NADPH oxidases". *Journal of Biological Chemistry* 283:16961-16965.
- NAUSEEF W.M., BORREGAARD N. (2014). "Neutrophils at work". *Nature Immunology* 15:602-611.
- NDJAMEN B., KANG B.H., HATSUZAWA K., KIMA P.E. (2010). "*Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments". *Cellular Microbiology* 12:1480-1494.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2019). "Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas". OPS. Washington, D.C.
- PATENTE T.A., PINHO M.P., OLIVEIRA A.A., EVANGELISTA G.C.M., BERGAMI-SANTOS P.C., BARBUTO J.A.M. (2019). "Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy". *Frontiers in Immunology* 9:3176.
- PEARSON R., STEIGBIGEL R. (1981). "Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes". *Journal of Immunology* 127:1438-1443.
- PETERS N.C., EGEN J.G., SECUNDINO N., DEBRABANT A., KIMBLIN N., KAMHAWI S., LAWYER P., FAY M.P., GERMAIN R.N., SACKS D. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies". *Science* 321:970-974.
- PODINOVSKAIA M., DESCOTEAUX A. (2015). "*Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction". *Future Microbiology* 10:111-129.
- PUENTES S.M., DA SILVA R.P., SACKS D.L., HAMMER C.H., JOINER K.A. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9". *Journal of Immunology* 145:4311-4316.
- REGLI I.B., PASSELLI K., HURRELL B.P., TACCHINI-COTTIER F. (2017). "Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing". *Frontiers in Immunology* 8:1558.
- REMALEY A., KUHNS D., BASFORD R., GLEW R., KAPLAN S. (1984). "*Leishmanial* phosphatase blocks neutrophil O<sub>2</sub>

- production". *Journal of Biological Chemistry* 259:11173-11175.
- RHODES J.W., TONG O., HARMAN A.N., TURVILLE S.G. (2019). "Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection". *Frontiers in Immunology* 10:1088.
- RIBEIRO-GOMES F.L., PETERS N.C., DEBRABANT A., SACKS D.L. (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response". *PLOS Pathogens* 8:e1002536.
- RODRIGUEZ P.C., OCHOA A.C., AL-KHAMI A.A. (2017). "Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity". *Frontiers in Immunology* 8:93.
- SACKS D., NOBEN-TRAUTH N. (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice". *Nature Reviews in Immunology* 2:845-858.
- SALEI N., HELLBERG L., KÖHL J., LASKAY T. (2017). "Enhanced survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells". *PLOS One* 12:e0171850.
- SARKAR A., AGA E., BUSSMEYER U., BHATTACHARYYA A., MOLLER S., HELLBERG L., BEHNEN M., SOLBACH W., LASKAY T. (2013). "Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis". *Medical Microbiology and Immunology* 202:25-35.
- SCHUSTER S., HURRELL B., TACCHINI-COTTIER F. (2012). "Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process". *Journal of Leukocyte Biology* 94:671-675.
- SHARMA S., DAVIS R.E., SRIVASTVA S., NYLEN S., SUNDAR S., WILSON M.E. (2016). "A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis". *Journal of Infectious Diseases* 214:1531-8.
- SØRENSEN A., HEY A., KHARAZMI A. (1994). "*Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro". *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 102:265-271.
- TIBÚRCIO R., NUNES S., NUNES I., AMPUERO M.R., SILVA I.B., LIMA R., MACHADO TAVARES N., BRODSKYN C. (2019). "Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View". *Frontiers in Immunology* 10:227.
- TURCO S.J., SACKS D.L. (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes". *Molecular and Biochemical Parasitology* 45:91-99.
- UENO N., WILSON M.E. (2012). "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival". *Trends in Parasitology* 28:335-344.
- VAN ZANDBERGEN G., KLINGER M., MUELLER A., DANNENBERG S., GEBERT A., SOLBACH W., LASKAY T. (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages". *Journal of Immunology* 173:6521-6525.
- VON STEBUT E., TENZER S. (2018). "Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*". *International Journal of Medical Microbiology* 308:206-214.
- WALKER D.M., OGHUMU S., GUPTA G., MCGWIRE B.S., DREW M.E., SATOSKAR A.R. (2014). "Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites". *Cellular and Molecular Life Sciences* 71:1245-1263.
- WANASEN N., SOONG L. (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection". *Immunologic Research* 41:15-25.
- WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASIS & WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010). "Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis". World Health Organization. Geneva.
- YAO C., DONELSON J.E., WILSON M.E. (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function". *Molecular and Biochemical Parasitology* 132:1-16.
- YOUNG J., KIMA P.E. (2019). "The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface". *Yale Journal of Biology and Medicine* 92:511-521.

# Modelo para el tratamiento de leishmaniasis cutánea: interdisciplinariedad biomédico, clínico y socio-antropológico

José Carrero<sup>1,2</sup>

jcarrero1@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3797-6117>

Noris Rodriguez<sup>2</sup>

nmrodric@gmail.com

Eliana Carrero<sup>1</sup>

elianacarrero0@gmail.com

Alberts Carrero<sup>2</sup>

ajsony\_22@hotmail.com

Lexis Carrero<sup>3</sup>

lesxis13@gmail.com

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Universidad de los Andes.

<sup>2</sup>Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup>Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

Heridas ó ulceras cutáneas han sido un reto de la humanidad y abordadas según contexto histórico social, impacta sociedades en bajo desarrollo, grandes urbes y es exacerbada en procesos antropogénicos. Así, en Venezuela, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) tomando en cuenta la situación sociocultural perdurará en el tiempo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se cataloga como enfermedad desatendida, de impacto según la pobre respuesta social de salud, haciéndola un problema de salud pública. El tratamiento con calidad de vida exige acciones biomédicas, clínicas y socioantropológicas (articuladas), sin embargo, lo contrario es cotidiano, el clínico acciona en concordancia o "no" a lo biomédico y socio-antropológico y esta última acciona aparte de lo biomédico y clínico, ocultando aspectos adversos para el proceso de cicatrización (PC) ó biológico (proceso natural). Objetivo, diseñar un modelo interdisciplinario (biomédico - clínico - socioantropológico) en respuesta a las necesidades del enfermo. Metodología, abordando niveles de investigación: 1) Organización en un solo esquema, las disciplinas (Diagrama de Venn); 2) Comparar las disciplinas conceptualmente (Análogos - Tópico) y 3) Creación del modelo Condición - Respuesta (Acción). Resultado: un modelo interdisciplinar de respuesta integral. Conclusión: con el modelo interdisciplinario se descubren aspectos ocultos (clínicos y socio antropológicos) que potencian el proceso de cicatrización.

**Palabras clave:** Leishmaniasis; interdisciplinariedad; biomédico; clínico; socio antropológico; cicatrización.

## MODEL FOR THE TREATMENT OF LEISHMANIASIS: INTERDISCIPLINARITY (BIOMEDICAL, CLINICAL AND SOCIO-ANTHROPOLOGICAL)

### ABSTRACT

Wounds or skin ulcers have been a challenge of the humanity and addressed

according to the historical social context, impacting underdeveloped societies, large cities and is exacerbated in anthropogenic processes. In Venezuela, localized cutaneous leishmaniasis (LCL) given the sociocultural situation will persist. According to the World Health Organization (WHO) it is classified as a neglected disease, of impact according to the poor social health response, making it a public health problem. Treatment with quality of life requires biomedical, clinical and socio-anthropological actions (articulated), however, the opposite is daily, the clinician acts in accordance or "not" with the biomedical and socio-anthropological and the last one acts alone without the biomedical and clinical, hiding adverse aspects for the healing or biological process (natural process). Objective: to design an interdisciplinary model (biomedical - clinical - socio-anthropological) in response to the needs of the patient. Methodology: addressing research levels: 1) Organization in a single scheme of disciplines (Venn diagram); 2) To compare the disciplines conceptually (Analog - Topic) and 3) Creation of the Condition - Response (Action) model. Result: an interdisciplinary model of comprehensive response. Conclusion: with the interdisciplinary model, we can discover hidden aspects (clinical and socio-anthropological) that enhances the cicatrization process.

**Keywords:** Leishmaniasis; interdisciplinary; biomedical; clinical; socio anthropology, cicatrization.

## INTRODUCCIÓN

Las heridas ó úlceras en piel han sido un reto de la humanidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) describe que impacta a sociedades de bajo desarrollo, grandes urbes y se exagera en procesos sociales antropogénicos. Una de estas enfermedades se encuentra en Venezuela, conocida como leishmaniasis cutánea localizada (LCL), que según Carrero *et al.* (2001, 2016, 2018) dada la situación sociocultural, está presente en mayor proporción en áreas rurales y se prevé que persista en los próximos tiempos, siendo descrita por la OMS como "enfermedad desatendida". En Venezuela se estiman 2.388 casos / año (tasa: 10,5/ 100.000 hab.), en todos los grupos etarios, de forma clínica frecuente ulcerada

(97,9%) en LCL (De Lima *et al.*, 2010). El Ministerio del Poder Popular Para la Salud (MPPS), reporta a todo el país endémico, y en la región andina tasas superiores a 30/100.000 hab., presumiéndose mayor, por fallas del sistema de vigilancia y de atención inaccesible (geográfica, cultural, económica, organizativa). Carrillo *et al.*, (2014), proponen que el abordaje de curación exige claridad del complejo entramado socioantropológico, biológico y clínico, cuyo accionar debe poseer: a) Sincronía (perfecta correspondencia temporal, intervalos ó velocidad) y b) Simbiosis (relación de ayuda o apoyo mutuo establecido entre dos ó más entidades que trabajan por algo en común). En tal sentido, la respuesta social del sector salud, es débil de estructura y no dispone del material (gasa, apósitos, vendas, antibiótico, analgésico) ni tratamiento específico anti-Leishmania (antimonial). El técnico en salud aun conserva el paradigma de "cura seca o tradicional" de enfoque infeccioso bacteriano, traumática y dolorosa, lo cual limpia la lesión con retraso de cierre, aun cuando se cumpla el tratamiento antiparasitario. Es el paciente que opta a la "curación espontánea" apelando al contexto socioantropológico utilizando la representación social ó códigos culturales y despliegan conductas erráticas que prolongan la cura total de la ulcera. De manera que, lo inicial es parasitario, con adicional infección secundaria bacteriana, a la cual los mismos pacientes y "cuidadores" añaden estimulantes inflamatorios directos (químicos, físicos, biológicos) e indirectos (incumplir reposo adecuado: posición anti edema, cubrir úlceras con apósitos y material de sustentación).

Ante el parásito, la respuesta biológica (celular – humoral) se activa como proceso de control y cicatrización y al mismo tiempo, en paralelo hay dos intervenciones: 1) Respuesta del técnico en salud (médico – enfermera) en concordancia o "no" al proceso biológico y 2) Respuesta de familiar ó cuidador en el domicilio y siempre "desapercibida" con un "quehacer" cotidiano rico en concepciones socioculturales que coadyuvan o "no" el accionar del técnico y la respuesta biológica en desarrollo. Un

complejo reto es, articular lo Biomédico (celular – humoral), Clínico (médico – enfermera) y Socio-antropológico (cuidador – entorno familiar). En este trabajo se plantea como objetivo diseñar un modelo interdisciplinario para tratamiento, que responda a las necesidades más sentidas en los enfermos de LCL.

## METODOLOGÍA

La metodología aplicada se enfoca por nivel de investigación: 1) Esquema disciplinar (Diagrama de Venn); 2) Comparación de las disciplinas conceptualmente (Análogos – Tópico) y 3) Creación del modelo Condición – Respuesta (Acción).

1) **Esquema disciplinar**, utiliza el conocimiento de cada disciplina para la nueva situación llamada interdisciplinar, la cual ilustra lo relacional - lógico (Figura 1).

Con la superposición o intersección de tres conjuntos (círculos) que serían los límites de cada disciplina (Socioantropológica, Biomédica y Clínica), se crea un área central común o interdisciplinar que corresponde a las características similares entre sí, denominados “Componentes” (Tejido, Inflamación, Granulación, Reposo, Epitelización) representados por el acrónimo TIGRE, en base a la literatura clínica - biológica para el proceso de curación.

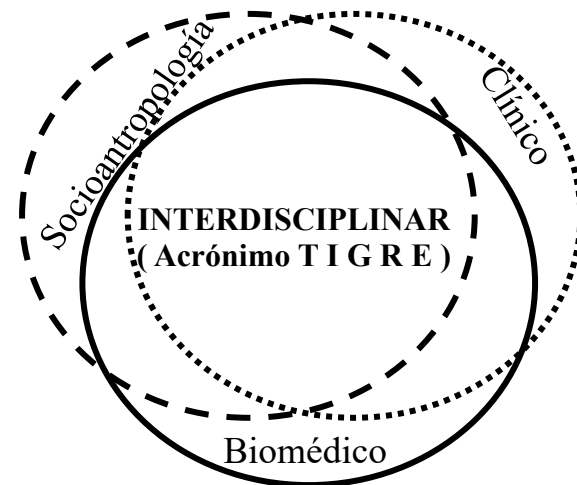
2) **Modelo conceptual (Análogo – Tópico)**, García, B (2007) plantea que al dividir el conocimiento de cada disciplina se revelan las relaciones entre ellas. Al relacionar dos situaciones, la familiar al investigador, con otra nueva o desconocida, se ejercen puentes que facilitan conectar el previo conocimiento y el que se pretende aprender. Se transfiere conocimiento de lo conocido ó “análogo” (disciplinas biomédica y clínica) a lo desconocido ó “tópico” (disciplina socio-antropológica) en sus características semejantes ó de interés, como son: **Los componentes** (Tejido, Inflamación, Granulación, Reposo, Epitelización). El análogo y el tópico como disciplinas poseen características semejantes y otras que difieren, como en este caso lo es, el actor - espacio de acción, donde tenemos; la biomédica (Célula-Orgánico), clínica (Técnico-Institucional) y la socioantropológica

(Familiar-Domicilio). **Los atributos**, son las características de los componentes. **Nexos**, las conexiones entre los elementos de los componentes. Se teje o trama lo relacional de los componentes de cada disciplina, llamada **trama de relaciones o relación analógica**, un contexto “oculto” denominado interdisciplinar.

3) **Modelo Condición – Respuesta (Acción)**. Tabla 2, es el todo interdisciplinario y lo relacional ante la necesidad sentida, disciplinas, dimensiones ó componentes, discrepancias ó coincidencias, plan terapéutico - operativo, monitoreo - evaluación y las metas integrales. Se confrontan dos aspectos: 1) Una condición ó perspectiva de análisis. 2) Respuesta interdisciplinar (Acción) control de LCL.

## Modelo propuesto

Esquema disciplinar (Diagrama de Venn)



**Figura 1.** Modelo para el tratamiento de leishmaniasis cutánea: interdisciplinariedad (biomédico, clínico y socio-antropológico).

Curar leishmaniasis exige accionar al menos tres disciplinas: 1) biomédica, se ocupa de procesos del nivel sub-individual; 2) clínica, aplica al individuo que previene, diagnóstica y hace terapéutica y 3) socio-antropológica, aplica a familiares y entorno cotidiano con el saber popular en LCL.

## DISCUSIÓN

La LCL se asocia con pobreza, analfabetismo, no obstante, la comunidad es muy rica en concepción socio-antropológica manejando lesiones abiertas (MPPS, 2019). En tratamiento clínico prevalece lo biomédico (quimioterapia) como monoterapia que lo “resolverá todo” una razón necesaria mas no suficiente. El programa de control enmarca manejar la lesión aislada del contexto general del paciente en cotidianidad domiciliar (calidad de vida, dolor, miedo al aseo local, minusvalía, frustración, sexualidad, economía, laboral) y los códigos culturales como enfrenta la situación sentida. Es básico reconocer el valor cotidiano (interrelación de vida y producción comunitaria) un espacio capital (socioantropológico) ignorado o desechado como representación social en escenario natural. Por cual se plantea:

**1) Esquema interdisciplinar**, al manejar úlceras obligan a fusionarse, creando espacio común o nueva realidad, la *Interdisciplinarietà*, siendo la sumatoria de las disciplinas, representadas por el acrónimo TIGRE, el cual da autenticidad a cada disciplina indicando solución al problema bajo principios o generalizaciones integrales.

**2) Modelo conceptual (Análogo – Tópico)**, se organiza en dos partes, Análogos (biomédico y clínico); Tópico (socio-antropológico), permiten revelar significados ocultos en esta disciplina, pues sus códigos culturales en cicatrización en general son adversos a la curación, como por ejemplo, aplicar sustancias de uso veterinario, industrial o domésticos. Su estructura considera las disciplinas, componentes, nexos, atributos y malla o relación analógica (Tabla 1)

Las *Disciplinas*, todas en un objetivo, control del parásito y la cicatrización. Sin embargo los actores, escenarios y acciones difieren, la biomédica (macrófagos – tejido cutáneo), la clínica (médico / enfermera – servicios de salud) y la socio-antropológica (cuidador / familiar – domicilio) las cuales si se aplican, se obvian o minimizan entre sí frecuentemente, lo que distorsiona el objetivo.

Los *Componentes*, son el elemento común entre las disciplinas, en concordancia a la literatura científica del PC representan relación lógica secuencial. Así,

ante injuria de la picada del vector y el inoculo del parásito, se activa la acción celular para un Tejido característico, Inflamación, proliferación (Granulación y Epitelización) obviando la última fase ó maduración al considerarse curada. Insertando el Reposo, un componente de alto contenido socio-antropológico en el cual se ocultan múltiples elementos, obviados en la disciplina clínica cuyos efectos impactan directa e indirectamente en la disciplina biológica. Se entrecruzan los componentes, el tejido sucio (necrótico) incrementa la inflamación con disminución de la granulación y epitelización, una acepción muy similar al no acatar el reposo.

Teóricamente, todas las disciplinas inducen al proceso de cicatrización, generalmente bien desarrollada en lo biológico (Biomédico) pero interferida. En lo práctico, la disciplina clínica sus cuidadores aplican la Cura seca (traumática – dolorosa) y el reposo que junto a la disciplina Socio-antropológica, en la cual sus cuidadores familiares aplican sus “saberes” generan en conjunto al componente Tejido, con los atributos de material necrótico, esfacelos y cuerpos extraños, y en caso contrario el tejido es vitalizado o “limpio” considerado el óptimo para las subsiguientes fases: inflamación, granulación y epitelización. En tejido expuesto lo frecuente es la contaminación e infección bacteriana, un estímulo más a los inflamomas que potencian al componente Inflamación, de efecto directo y adverso a componentes Granulación y Epitelización del proceso biomédico. Los Atributos, son las características por componente y siendo similar entre disciplinas, pero cada una asigna nombre a cada condición, ver tabla 1. Considerar, la siempre inadvertida e inicial respuesta de atención del enfermo en el seno familiar, una fuente capital al cuidado principalmente por la mujer, con tiempo e insumos de conocimientos socio-antropológicos en cantidad considerable, así la ineludible capacitación técnica paciente - cuidador, en función de sus códigos culturales, transformarlos en fortalezas para curar la ulcera en concordancia a lo biomédico y clínico, cuyo principio de curación es el óptimo ambiente del lecho ulcerado, logrado con adecuado tejido viable, mínima

**Tabla 1.** Modelo para el tratamiento de leishmaniasis cutánea: interdisciplinariedad (biomédico, clínico y socio-antropológico).

INTERDISCIPLINARIEDAD			
COMPONENTES (Similitud)	ATRIBUTOS		
	ANALOGOS		TOPICO
	BIOMÉDICO (Celular – Humoral)	CLÍNICO (Médico – Enfermera)	SOCIOANTROPOLÓGICO (Cuidador directo - Entorno familiar)
-Tejido	<i>Solución de continuidad de piel</i> al picar vector e inculo de leishmanias y fagocitosis. Hay <i>necrosis celular</i> . Es el proceso biológico al control de infección y fases de cicatrización.	<i>Leishmaniasis cutánea, úlcera</i> . Hay <i>Tejido necrótico, esfacelo, cuerpos extraños</i> . Procede con Cura seca ó Húmeda + terapia antileishmania. Es el proceso técnico control que puede optimizar ó “no” la cicatrización.	<i>“Picada de pito, grano, llaga”</i> Hay <i>“carne muerta, negra, costra, mal oliente”</i> Procede con hojas de plantas calientes, alcohol, arcilla, “chimo” sábila ( <i>Aloe vera</i> ), “panela” ó “pomos caseros” + “rezo”. Es el proceso de expresión del saber popular que coadyuva a “sanar o no”.
-Inflamación	<i>Respuesta celular – humoral</i> . Es el accionar ante la picadura e inculo parasitario y bacterias, activan macrófagos y células Langerhans (inflamomasomas y citoquinas). Igual frente a agentes químicos (jabones) y físicas (trauma, agua caliente).	<i>Respuesta de atención técnica</i> . Es el accionar técnico al tejido inflamado: rubor, tumor, dolor, calor, secreción. Aplica Cura Húmeda, desbridado, antibiótico + antiinflamatorio. A menudo usa Cura Seca (estímulo inflamatorio: iatrogenia). Proceso que optimiza o “no” la cicatrización.	<i>Respuesta sociocultural</i> . Es el accionar comunitario frente la “Picadura hinchada, caliente, dolorosa, roja, de mal olor con sanguaza ó postema”. Aplica preparados botánicos, veterinarios, domésticos, industrial y médicos de efecto químico y físico (sustancias calientes + curas traumáticas diarias sangrantes”. Proceso que coadyuvan a “sanar o no”.
-Granulación	Los <i>Fibroblastos proliferan y migran + factor de crecimiento</i> forman vasos sanguíneos nuevos. El proceso es biológico.	Refieren: <i>Tejido granular</i> , de aspecto carnososo, granular, rosado pálido ó tejido vivo. El proceso clínico optimiza ó “no” la cicatrización.	Refieren: <i>“Picada rellenando, curando ó carne nueva”</i> Apoyos en: “rezos” “tapar llaga con trapos” + etnobotánica a alta temperatura. Es el saber popular que coadyuva a “sanar ó no”.
-Reposo	<i>Cuidado biológico</i> , sin injurias (biológicas, químicas, físicas) la acción celular - humoral merma. Es el proceso de homeostasis, cual compensa ó equilibra el cambio local.	<i>Cuidado técnico</i> , controla estímulos inflamatorios: a) biológicos, físicos, químicos. b) consejería antiedema (posicional, vendaje, fisioterapia). Es el técnico de salud según lo propicie, optimiza ó “no” la cicatrización.	<i>Cuidado familiar</i> , aplican la etnobotánica ó sustancias químicas + lo mágico - religioso. Con frecuencia cuidados técnicos - clínicos se obvian o modifican. Es el cuidador cotidiano y el proceso sociocultural por códigos culturales que pueden coadyuvar ó no “sanar”.
-Epitelización	Los <i>Queratinocitos proliferan y migran</i> al borde y centro ulcerado. El proceso es biológico.	Se refieren a: <i>Epitelizó ó cicatrizó</i> hay tejido rosado – nacarado desde los bordes al centro ulcerado. El proceso clínico coadyuva ó “no”.	Se refieren a: <i>“Se sano, se curó ó se alentó de la picada, le sirvió el rezo” ó Eficacia simbólica</i> . Los “baños tibios mejoran”. Es el saber comunitario que coadyuva o “no sanar llagas”.

inflamación, reposo disciplinado, granulación y epitelización. En lo operativo, ideal es accionar con Cura húmeda, vigilancia y control de estímulos adversos, pues cicatrización es un proceso biológico, complejo y sistematizado desarrollado por sí mismo, solo exige condiciones óptimas para su desarrollo.

**3) Modelo Condición - Respuesta**, basada en dos aspectos: 1) Condición o perspectiva de análisis: Ulceras de LCL y 2) Respuesta social: Objeto de la intervención. Se considera una situación nueva o de abordaje a la comprensión del enfermo, por lo cual el modelo emerge desde los propios pacientes, dada su condición de Necesidad sentida (El problema) ante la LCL expresadas o no, como percepciones subjetivas influenciadas por previas experiencias del enfermo o mensajes originarios de las comunidades según sus códigos culturales. En tal sentido, las representaciones sociales se describen así (Tabla 2). En un lecho ulcerado “carne muerta, negra, costra, mal oliente, restos de cremas” (Lesión sucia), con síntomas y signos de “Picada hinchada, caliente, dolor, roja, con sanguaza o postema”, la cual bajo tratamiento observa “La picada no rellena, no cura o sin carne nueva” y en cuyo entorno cotidiano hay presión laboral, familiar y otros inducen aplicar: cremas, cura seca, “rezos”, etnobotánica a altas temperaturas, sustancias de uso veterinario, domesticas e industrial causando mayor “Dolor por lastimar diariamente” y en definitiva “La picada no sana, no cura”. Esta condición mórbida y psicoemocional plantea estados de estrés y depresión que alteran la fisiología inmunitaria, alteran la regulación de la metaloproteinasa de la matriz extra celular y la expresión de sus inhibidores tisulares, eventos adversos a la cicatrización. Dificultades económicas, presión social (laboral, académica), aislamiento social, ansiedad, depresión y dolor no solo son causas del retraso de cicatrización sino que influyen en estos de manera considerable. El dolor y alteración del sueño se asocia a respuestas neuroendocrinas de influencia en la inflamación y resistencia del huésped. Un exudado abundante es angustioso al paciente asociado a dolor y olor, causa repulsión intrafamiliar y amigos que influye en la relación personal, son elementos adversos a la

cicatrización. Gómez *et al.* (2000), García B (2007), Carrillo *et al.* (2014) y Martens (1999), describen, diferentes expresiones culturales asociadas a la identificación de la LCL, así, la concepción de “Llaga”, se relaciona con estado psico-afectivo de: dolor, rechazo, vergüenza, tristeza o irrelevante, siendo aspectos ocultos ante la convencional terapéutica de la cual se ignora si es favorable o no para la curación, sin embargo al profundizar las observaciones se halla un definido accionar y respuesta terapéutica según se aborde cada condición. Las necesidades sentidas, exigen objetividad, se plantean las dimensiones o componentes en el plano técnico, científico y biomédico y enmarcadas en las fases del proceso de cicatrización, así se incorporan los vocablos: Tejido, Inflamación, Granulación, Reposo y Epitelización, haciendo la salvedad de no incorporar la última fase de maduración por considerar la “ulcera cerrada”. A su vez se representa con el Acrónimo TIGRE, (Fig 1) sigla configurada, que engloba o fusiona el proceso socio antropológico, biológico y clínico de la cicatrización. Se compone al unir las primeras letras del concepto de los componentes. Contiene la suma del significado de los términos que la componen, creando la nueva realidad. Una regla nemotécnica, artificiosa de corta palabra y fácil de recordar y relacionar elementos claves del manejo de úlceras. Su importancia: 1) ahorro de letras, palabras y espacio al escribir la historia clínica; 2) facilita la lectura; 3) apoyo nemotécnico recordatorio inmediato y sistemático de procesos complejos de cicatrización; 4) ayuda al familiar, pacientes y otros del área docente e investigación clínica. Estudiar las Disciplinas, Biomédicas/Clínico/Socio-antropológicas deben conjugarse en Análisis Interdisciplinar en el campo cualitativo. En tal sentido, entre disciplinas se discrepa o coincide en sus componentes. Teóricamente, lo biomédico (celular - humoral) un proceso natural de control parasitario, bacteriológico y cicatrización como respuesta biológica sigue patrones de respuesta natural, que exige simbiosis del accionar clínico y socio antropológico en un proceso de cicatrización unidireccional como un todo. Sin embargo, la socio-antropología acciona de forma

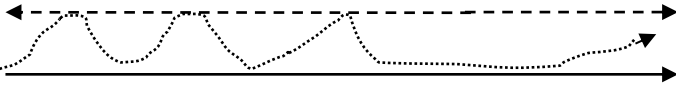

bidireccional, una a lo planteado como ideal y la otra contrapuesta al proceso biológico al accionar conductas erráticas (estímulos) que afectan al proceso (tejido, inflamación granulación y epitelización). Idealmente, el clínico debería direccionar apegado a lo biológico, no obstante discurre entre lo biomédico y socio antropológico, actúan según recursos, actualidad técnica, experiencias y sus propios códigos culturales, haciéndose eco en muchas ocasiones del saber socio-antropológico de forma auténtica o ignorándola, es decir un franco biologicista. Como un todo, el Plan terapéutico interdisciplinar, lo biomédico (Molecular/Celular) + clínico (Individuo) + socio-antropológico y Etnográfica (¿Qué? ¿Por qué? ¿Cómo es?), como respuesta o para revertir la necesidad sentida, una ulcera: “Limpia, No Hinchado, Rellenando, Reposo “Buen control” en busca del “Curar o Sanar”. Los técnicos en salud deben accionar basados en: 1) Factor conocimiento – habilidad procedimental; 2) Factor recursos (disponibilidad y accesibilidad); 3) Factores del paciente: psicosociales (representación social, ansiedad, depresión, sueño, hábitos, nivel económico, aislamiento), físicos (comorbilidad), adherencia terapéutica y 4) Factores de la lesión (tamaño como superficie y profundidad, ubicación anatómica, riego sanguíneo, estado del lecho ulcerado (inflamado, infección, material no vitalizado, cuerpos extraños), olor, secreción, piel perilesional y respuesta terapéutica. Patiño *et al.* (2017), refiere que el personal de salud del área rural está familiarizado con la clínica y epidemiología, sin embargo, hay vacíos respecto al diagnóstico e imprecisiones al tratamiento. Estricto es lo socio antropológico, exige la herramienta etnografía, aplicada en consulta médica, diagnóstico y tratamiento en interacción directa para comprender la forma en que actúa o entiende y representa la realidad. Hace integral el proceso clínico asistencial, el paciente estima ser escuchado y entendido como sujeto con historia y contexto socio antropológico en relación a tres esferas comprensivas: ¿Qué? ¿Por qué? y ¿Cómo es? Es descripción / interpretación de que piensan, dicen y actúan los pacientes, el técnico de salud no

explica la cultura o el evento, sino, más bien, interpretar o comprender porque no acuden a servicio de atención o porque aplican sustancias calientes (Monestel, 2012). Al abordar el proceso hay mucha realidad no identificada desde cada disciplina biomédica, clínica o socio antropológica, se hace ineludible cambiar tal realidad, y comprender cómo la biología desarrolla la cicatrización, cómo el técnico de salud interpreta la enfermedad, tratamiento e intervención y desde otra vertiente, lo que el paciente considera que es normal o no para actuar y practicar en función de alcanzar la cicatrización. El plan operativo interdisciplinar, se basa en cura húmeda bajo accionar del técnico entrenado, en ambiente social de cotidianidad y domiciliario. El Monitoreo y evaluación, a través de la Triangulación (AVC): Apoyo familiar, Valoración con el instrumento de evaluación (acrónimo TIGRE) y Cámara fotográfica (seguimiento gráfico). Meta Integral, 1) Calidad de vida y 2) Cicatrización cutánea.

Frenk (1997) se refiere a la interacción individuo - comunidad, conocimiento - quehacer, biológico - social, público - privado. En este contexto el modelo interdisciplinar es: 1) Inclusivo, engloba el conocimiento desde lo cotidiano (necesidad sentida) hasta lo científico (cicatrización), reconoce lo multidimensional e interactivo, factores ocultos que la influyen las ciencias biológicas, socio-antropológica y clínica. 2) Dinámico, los cambios biológicos del PC por el accionar socio-antropológico y clínico permiten comprender no sólo el dolor, calor, rubor y tumor sino también qué pasó y cómo ocurrió y la futura trayectoria de éxito o falla de curación. 3) Integrador, las acciones como disciplinas difieren entre sí en ciertos aspectos, sin embargo, se interrelacionan en muchos otros. El PC no se desarrolla en el vacío, sino en un seno familiar, social, cultural, tradiciones, clínico, mágico religioso, ambiente, vivienda, el cuerpo como símbolo, económico, político, haciendo requerir desempeños más allá del factor necesario y no suficiente. “La atención médica” sin negar la gran importancia, no es el accionar de unas ciencias sobre otras, lo biologicista

no se reemplaza por lo sociologicista, al contrario, es integración disciplinar científica en simbiosis y sincrónica.

**Tabla 2.** Modelo Condición – Respuesta (Acción). Modelo para el tratamiento de leishmaniasis cutánea: interdisciplinariedad (biomédico, clínico y socio-antropológico).

CONDICIÓN <i>Perspectiva de análisis: LCL</i>	RESPUESTA INTERDISCIPLINAR <i>Acciones: aspectos técnicos necesarios a considerar</i>				
- Necesidad sentida por resolver (El problema)	<i>“carne muerta, negra, costra, mal oliente, restos de cremas”</i>  <i>(Lesión sucia)</i>	<i>“Picada hinchada, caliente, dolor, roja, mal olor con sanguaza ó postema”</i>	<i>“La picada no rellena, no cura ó sin carne nueva”</i>	Presión laboral, familiar y otros inducen aplicar: cremas + cura seca + “rezos” + etnobotánica caliente y ++ <i>“Dolor diario por lastimar”</i>	<i>“La picada: - No sana - No cura”</i>
- Dimensión ó Componente	Tejido (Necrosis celular)	Inflamación “Inflamosomas”	Granulación (Proliferación)	Reposo (Estímulos)	Epitelización (Proliferación)
- Acrónimo	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>E</b>
- Disciplinas	Enfermería, Medicina, Biología, Dermatología, Epidemiología, Antropología				
- Análisis (Interdisciplinar)	<b>Biomédico + Clínico + Socioantropológico</b> <i>(Cuantitativo) (Cualitativo)</i>				
- Discrepancia ó Coincidencia (Interdisciplinar)	- Socioantropológica - Clínica - Biomédica				
- Plan terapéutico (Interdisciplinar)	Molecular + Celular + Individual + Etnográfica <i>¿Qué? ¿Por qué? ¿Cómo es?</i>				
- Plan operativo (Interdisciplinar)					
- Monitoreo y evaluación (Triangulación) (Interdisciplinar)	Tejido vivo, proporción de Lu. sin restos necróticos ó esfacelos <i>“Limpia”</i>	Inflamación, síntomas y signos de flogosis <i>“No Hinchado”</i>	Granulación, proporción de Lu. en granulación <i>“Relleno”</i>	Reposo, presencia de factores protectores <i>“Buen control”</i>	Epitelización Proporción de Lu. epitelizado <i>“Curado ó Sano”</i>
- Meta (Integral)	1) Restituir calidad de vida ( <i>Física, Psicológica, Social y Funcional</i> ). 2) Cicatrizar la lesión en contexto anatómico-funcional.				

Lu: Lecho ulcerado.

## CONCLUSIONES

El modelo interdisciplinar revela aspectos ocultos (clínicos y socioantropológicos) que direccionan el protocolo, para tratar el enfermo con Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) y así potencian el Proceso de Curación (PC), es decir, unidos para dar una respuesta integral.

## REFERENCIAS

- CARRERO J., CHIPIA J., CASTILLO-GAGLIARDI D., CARRERO E., CASTILLO D. (2016). “Eficacia del apósito bioactivo natural versus convencional en cicatrización cutánea”. *Gicos* 1(4):3-22.
- CARRERO J., CHIPIA, J., CASTILLO D. (2016). “Cicatrización cutánea, factores que influyen en su efectividad”. *Gicos* 1(3):34-60.
- CARRERO J., BORGES R., CONVIT J., GARCÍA J., ROVIRA A., DE LIMA H. (2011). “Immunotherapy of cutaneous leishmaniasis: factors that influence their effectiveness”. *Bol Mal Salud Amb* 51(1):25-33.

- CARRILLO L.M., TRUJILLO J.J., ÁLVAREZ L., VÉLEZ I.D. (2014). "Estudio de los conocimientos, actitudes y prácticas de la leishmaniasis: evidencias del olvido estatal en el Darién Colombiano". *Cad Saúde Pública* 30(10):2134-2144.
- DE LIMA H., BORGES R., ESCOBAR J., CONVIT J. (2010). "Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007". *Bol Mal Salud Amb* 50(2):283-300.
- FRENK J. (1997). "La nueva salud de la población. Hacia una nueva salud pública. fondo de cultura económica". México, DF.
- GARCÍA B. (2007). "Aporte de la etnografía en el conocimiento de los códigos socioculturales de la leishmaniasis cutánea localizada en un programa de educación para la salud, en Venezuela". *Cad Saúde Pública* 23(1):S75-S83.
- GÓMEZ L., CORREDOR A. (2000). "Caracterización Sociocultural y Epidemiológica de un Foco de Leishmaniasis Cutánea en Cimitarra, Santander". *Rev Salud Pública* 2(3):261-271.
- GONZÁLEZ G.B.M. (2005). "El modelo analógico como recurso didáctico en ciencias experimentales". *Revista Iberoamericana de Educación* 37(2):2005
- MARTENS R. (1999). "Una aproximación antropológica a la enfermedad de la leishmaniasis en la cordillera andina de Mérida". *Revista Talleres* 6:Noviembre.
- MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD. (2019). "Programa de Control de Leishmaniasis. Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control". República Bolivariana de Venezuela.
- MONESTEL Z.P. (2012). "Dimensión sociocultural de la Leishmaniasis cutánea entre los cabécares de Chirripó de Turrialba, Costa Rica". *Cuadernos de Antropología* 22:1409-3138.
- OMS (2014). "Enfermedades olvidadas (Leishmaniasis)". En: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40370&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40370&lang=es)
- OMS (2014). "Enfermedades olvidadas (Leishmaniasis)". En: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40370&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417:2014-informacion-general-leishmaniasis&Itemid=40370&lang=es)
- OMS (2016). "Leishmaniasis". En: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- PATÍÑO S., SALAZAR L.M., TOVAR A.C., VÉLEZ I. (2017). "Socio-epidemiological and cultural aspects of cutaneous leishmaniasis: conceptions, attitudes and practices in the populations of Tierralta and Valencia (Cordoba, Colombia)". *Salud Colectiva* 13(1):123-138.
- PÉREZ Á. (2012). "La etnografía como método integrativo". *Revista Colombiana de Psiquiatría* 41(2):421-428.
- ZERPA O., QUIÑONES A., RUIZ M., RODRÍGUEZ N., LORZ K., MERCADO D., RONDÓN A., CONVIT J. (1998). "Estudio clínico epidemiológico y caracterización taxonómica de leishmaniasis tegumentaria americana en la comunidad indígena waramas en de Santa Elena de Uairén, Gran Sabana". *Dermatología Venezolana* 36(3):113-117.

# Reseña de las investigaciones sobre la infección del virus del papiloma humano en el Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit"

**María Eugenia Cavazza**<sup>1,2</sup>

cavazzaster@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5722-1942>

**Diana Ortiz-Princz**<sup>1,2</sup>

dprincz@gmail.com

**Maira Avila**<sup>3,4</sup>

avimaira@gmail.com

**Maria Correnti**<sup>4</sup>

mcorrentip@yahoo.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Escuela de Medicina "Dr. José María Vargas", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Odontológicas "Dr. Raúl Vincentelli", Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.

<sup>4</sup>Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## RESUMEN

A partir de 1997 se empezaron a formar grupos de investigación local y nacional en Venezuela, con el objetivo de evaluar la prevalencia de Virus de Papiloma Humano (VPH) en distintas entidades, la disponibilidad de tecnologías para su detección y la prevalencia de la infección del virus en el país. El Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" se unió a esos esfuerzos, las investigaciones aún continúan a pesar de la grave crisis que se vive en Venezuela actualmente. El cáncer del cuello uterino representa la segunda causa de muerte oncológica en la población femenina en Venezuela. Metodología: Se realizó una búsqueda sistemática de las publicaciones sobre el VPH en las cuales el Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit MPPS-UCV ha participado. Resultados: Se empleó el sistema Prisma para la selección definitiva de las publicaciones por medio del cual se ubicaron 23 referencias que cumplieron con los criterios de inclusión. Conclusiones: Este trabajo reúne los resultados más importantes obtenidos por el grupo de investigación en el cual ha participado el Instituto a través del Laboratorio de Microbiología Molecular, señalando los datos más importantes con proyección de mejorar la calidad de los diagnósticos moleculares, diseñar las investigaciones para establecer la prevalencia en la población venezolana sin restringirla a pacientes con lesiones y evaluar la instrumentación a futuro de la introducción de vacunas contra el VPH, contribuyendo así a la disminución significativa del desarrollo de cáncer de cuello y otras patologías asociadas a este virus.

**Palabras clave:** Virus Papiloma Humano; Lesiones intraepiteliales; Cáncer de cuello uterino; Lesión bucal; Vulva.

## REVIEW OF RESEARCH ON HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AT THE DR. JACINTO CONVIT BIOMEDICINE INSTITUTE

### ABSTRACT

Since 1997, local and national Venezuela research groups began to form with the aim to assess prevalence of HPV in different entities, availability of technologies for detection and prevalence of virus infection. Institute of Biomedicine Dr. Jacinto Convit joined these efforts, research still continues despite a serious crisis in Venezuela today. At this time cervical cancer represents second leading cause of cancer death in female population in Venezuela. Methodology: A systematic search was conducted about publications on Human Papilloma Virus Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Biomedicine Dr. Jacinto Convit –UCV were participated. Results: Prism system was used for final selection of publications; 23 references met inclusion criteria. Most relevant results of 8 publications within 23 references were detailed. Conclusions: This work brings together most important results obtained by the research group in which Institute has participated through Molecular Microbiology Laboratory. Important data from future-focused studies to improve quality of molecular diagnoses, prepare research to establish prevalence in Venezuelan population without restricting it to patients with injuries, and assess future implementation for introduction of HPV vaccines, a way to significantly decrease not only the development of cervical cancer but decline of other pathologies associated with this virus.

**Keywords:** Human Papilloma Virus; Intraepithelial lesions; Cervical cancer; Mouth lesion; Vulva.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CCU) es una de las principales enfermedades que afecta la salud de la población femenina. Al ser una enfermedad prevenible, con altas tasas de mortalidad se le considera un problema de salud pública a nivel mundial. (Kuelker y Wassie, 2012). Afecta en mayor medida a los países con bajos y medianos ingresos donde, además de ser más frecuente, se concentra la

mayor mortalidad con el 85 % por CCU (De Martel *et al.*, 2012; Moya y Pio, 2014).

Si bien numerosos factores causales son necesarios para la progresión de las alteraciones pre neoplásicas y el desarrollo de CCU, el factor necesario (pero no suficiente) es la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH); siendo esta la infección de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial. Los genotipos de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) ocasionan más del 95 % de los casos de CCU a nivel mundial, 70 % de estos casos están asociados a los tipos 16 y 18 (Ibáñez *et al.*, 2014)

En 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) pidió una acción mundial coordinada para eliminar el cáncer de cuello uterino, asegurando la inmunización de población infantil femenina contra los virus del papiloma humano (VPH), despistaje en mujeres mayores de 30 años y tratamiento para lesiones precancerosas. Estudios recientes con modelos matemáticos mostraron que una amplia cobertura de vacunación contra el VPH y la detección del cáncer de cuello uterino a partir de 2020, podría prevenir 12,5 a 13,4 millones de nuevos casos de este cáncer permitiendo lograr, para el 2070 la eliminación de los casos de cáncer de cuello uterino en la mayoría de los países (Simms *et al.*, 2019). Cabe destacar que la prevención primaria (vacunación contra el VPH) y la prevención secundaria (cribado del cáncer de cuello uterino) son componentes igualmente importantes de las estrategias de eliminación ya que actúan de forma aditiva interviniendo en diferentes momentos de la historia natural del cáncer de cuello uterino e implican acciones en las mujeres de diferentes edades (Poljak, 2015).

En este contexto, se unen esfuerzos para hacer que la investigación científica tenga impacto sobre la práctica clínica, contribuyendo en la atención a mujeres de menores recursos, las cuales se ven mayormente afectadas por el VPH. Por esta razón, hay que estimular las nuevas estrategias de prevención del CCU y otras enfermedades asociadas a VPH (Norrild, 2005).

En Latinoamérica existen distintos grupos de investigación relacionadas con el VPH y CCU, que

enfrentan serias dificultades para el avance, al compararse con las tendencias del resto de los países de altos ingresos, donde existen significativos avances en el desarrollo de vacunas, nuevos métodos de diagnóstico y técnicas de prevención, cambios en las estrategias de atención al paciente así como de iniciativas de prevención a nivel global.

Las estimaciones de prevalencia de VPH en Latinoamérica y sobre todo los de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) varían entre países, regiones y subregiones. Se ha estimado que la prevalencia global de la infección por VPH es de 45,9 % en población general. Respecto a la prevalencia de VPH-AR es del 12,7 %, hasta dos veces mayor que la de los VPH de bajo riesgo (VPH-BR). Para el Caribe se señala una prevalencia de VPH-AR del 15,8 % con valores más elevados (De la Hoz *et al.*, 2017).

La introducción de tamizaje local, nacional o regional depende del establecimiento de los criterios para su introducción, con base en la evaluación de sus beneficios en la población. Una decisión política del más alto nivel es necesaria en los programas para emprender transformaciones estratégicas y sostenidas en la lucha contra el CCU a través de las intervenciones de prevención; para ello se deben identificar las mejores estrategias con el objetivo de permitir a las mujeres vulnerables al CCU tener asistencia médica de primera.

En ese sentido, a partir de 1997 se empezaron a formar grupos de investigación local y nacional en Venezuela, con el objetivo de evaluar la prevalencia de VPH en distintas entidades clínicas, así como la disponibilidad de tecnologías para su detección. El Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit se unió a esos esfuerzos, las investigaciones aún continúan a pesar de la grave crisis que se vive actualmente. En este momento el cáncer del cuello uterino representa la segunda causa de muerte oncológica en la población femenina en el País.

Este trabajo reúne los resultados más importantes obtenidos por el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología Molecular, el cual colabora activamente junto al Servicio de Dermatología en el diagnóstico de VPH en las lesiones

de pene, vulva y piel provenientes de los pacientes que acuden al Instituto de Biomedicina.

Se señalan datos relevantes de los estudios con proyección a futuro, con el objetivo de mejorar la calidad en el diagnóstico molecular así como diseñar las investigaciones que permitan establecer la prevalencia en la población venezolana, sin restringirla a pacientes con lesiones, además de evaluar la instrumentación a futuro, para la introducción de vacunas contra el VPH. Con la finalidad de disminuir significativamente, no sólo el desarrollo de cáncer de cuello uterino sino el descenso de otras patologías asociadas a este virus.

## METODOLOGÍA

Se revisó la literatura científica publicada entre los años 1997 - 2019 en las principales bases de datos bibliográficas, revistas electrónicas, guías, libros y páginas webs acreditadas, las bases de datos revisadas fueron: Pubmed, ScienceDirect Google académico, SciELO. La estrategia de búsqueda bibliográfica se realizó utilizando palabras claves tanto en español como en inglés, y empleando términos de búsqueda de acuerdo a los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS) (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>) y de acuerdo a los encabezados de términos médicos MeSH (Medical Subject Headings) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

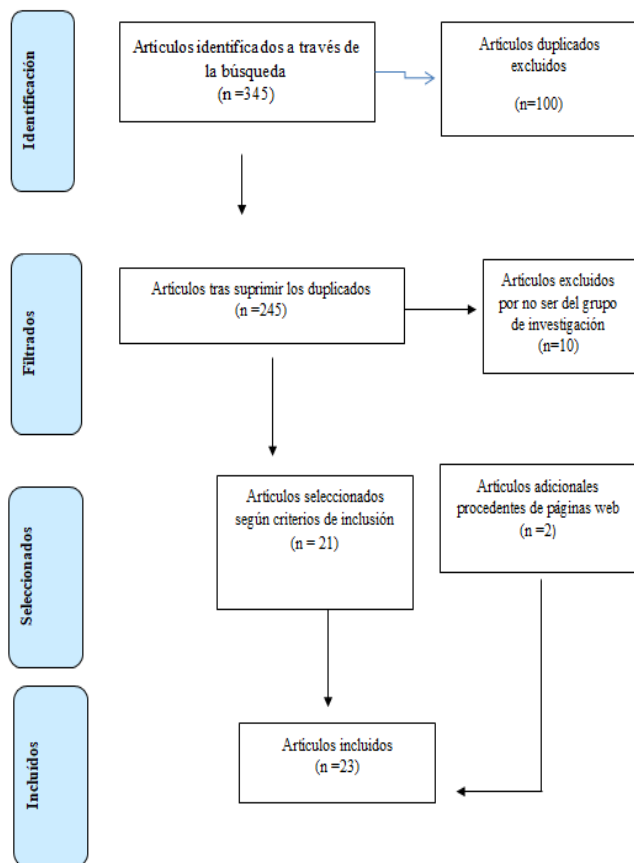
Se emplearon para la búsqueda los operadores lógicos booleanos: (AND, NOT, OR, XOR) en combinación con las palabras claves: virus Papiloma Humano, lesiones intraepiteliales, cáncer de cuello uterino, bucal y piel, verrugas, Venezuela.

**Criterios de inclusión:** Se incluyeron artículos científicos realizados por los grupos de investigación mencionados, tanto en español como en inglés. Se seleccionaron los que tenían acceso al texto completo y que incluyeran trabajos cualitativos y cuantitativos.

**Criterios de exclusión:** Revistas digitales con información general. Estudios narrativos.

## RESULTADOS

El proceso de selección de los estudios incluidos se puede observar detalladamente en la figura 1, mediante la metodología de Prisma.



**Figura 1.** Diagrama de flujo de la revisión. Tomado y modificado de Urrutia y Bonfill (2010).

La búsqueda de los artículos empleando la metodología de Prisma, permitió ubicar 23 artículos publicados en revistas indexadas en las cuales el grupo de investigación del Instituto de Biomedicina ha participado activamente. Se reseñaron aquellas investigaciones más relevantes sobre el virus de Papiloma Humano realizadas en el país.

## VPH y odontología

El cáncer de la cavidad oral representa en todo el mundo alrededor de 220.000 nuevos casos al año en hombres (5% de todos los cánceres) y 90.000 en mujeres (2% de todos los cánceres) (Parkin *et al.*, 1999). El cáncer en general representa la segunda causa de muerte en Venezuela y el sexto lugar está ocupado por el cáncer oral (Capote, 2015; Parkin *et al.*, 1999).

El papel etiológico de la infección por VPH en la patogénesis de las lesiones orales de precáncer y cáncer ha sido descrito por el descubrimiento del VPH en muestras de cáncer oral, así como por estudios de hibridación de ADN que revelan la presencia de VPH-11, 16 y 18 ADN en lesiones precancerosas orales y SCC. En el estudio realizado por Jiménez *et al.* (1998) empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y enzimas de restricción para la detección y genotipaje del VPH en biopsias tomadas de mucosa oral clínicamente normales de 20 sujetos sin lesión y otras muestras de lesiones clínicas de 40 pacientes, el genoma viral del VPH estuvo presente en el 55% (22/40) de las lesiones benignas orales (OBL) y en el 10% (2/20) de las muestras de control. En las OBL, se observó que el 90,9% eran VPH de bajo riesgo oncogénico (VPH-6, 13 y 32) y el 9,1% de las muestras tenían una infección mixta con tipos oncogénicos bajos y altos (VPH-6 y 16). En las muestras de control, se determinó a un paciente con VPH-6 y otro con VPH-6 y 16 en la misma muestra. Todos los ocho casos de hiperplasia epitelial focal fueron positivos para los tipos de VPH de bajo riesgo (88% VPH-13 y 12,5% VPH-32).

En conclusión, este estudio demuestra una alta incidencia de VPH en lesiones benignas orales de pacientes venezolanos.

Correnti *et al.* (1999) evaluaron la presencia de VPH en carcinomas de células escamosas orales (OSCC) en una población venezolana en las cuales se estudiaron dieciocho biopsias, fijadas en formalina e incluidas en parafina; 16 fueron diagnosticados como SCC. Se detectó VPH en el 50% (8/16) de los casos de SCC. De estas muestras VPH positivas, el 68% fueron diagnosticadas histopatológicamente como SCC moderadamente diferenciadas. La ubicación anatómica más común fue la mucosa de la cresta

alveolar. Todas las biopsias positivas contenían tipos de VPH de alto riesgo oncogénico. Se concluyó que existe una alta prevalencia de infección por VPH de tipos de alto potencial oncogénico en pacientes con SCC en este grupo de pacientes.

### **VPH y lesiones de cuello uterino**

El objetivo del estudio de Correnti *et al.* (2011) fue determinar la frecuencia de los genotipos del VPH-AR en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado (LSIL, HSIL) y carcinoma cervical (CC) entre las mujeres venezolanas. Se estudiaron pacientes con diagnóstico histopatológico de LSIL, HSIL y CC (LSIL-200; HSIL-100; CC-150). La detección y genotipo de VPH se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una hibridación reversa. La prevalencia específica del tipo de VPH se determinó en pacientes con infecciones individuales y múltiples.

El ADN del VPH se detectó en el 68%, 95% y 98,7% de los casos de LSIL, HSIL y CC, respectivamente. Se observó VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y VPH oncogénico de bajo riesgo (VPH-BR) en el 11,8% de los casos de LSIL, 3,2% de los casos de HSIL y 0,7% de los casos de CC. Los tipos de VPH -16 y 18 (65%) fueron los genotipos de VPH de alto riesgo más comunes en las muestras, seguidos de los tipos -52, -33, -45 y -31.

El estudio concluyó que la carga de la enfermedad, el cáncer de cuello uterino, en las mujeres venezolanas es alta. Los tipos de VPH-16 y 18 fueron los más prevalentes, seguidos de los tipos -52, -33, -45 y 31 (90,1%). Los resultados de este estudio proporcionan información de referencia sobre la distribución del tipo de VPH circulante, lo que puede facilitar el desarrollo de un programa nacional de prevención y control del cáncer de cuello uterino.

Los estudios realizados por Téllez *et al.* (2015) en 409 mujeres del estado Mérida en las cuales se identificaron lesiones intraepiteliales y se relacionó con la presencia de VPH. En una cohorte de esta población se comparó la infección persistente con lesiones citológicas, colposcópicas e histológicas. Se tomaron muestras cervicales para la detección molecular del virus. El VPH fue detectado por PCR

usando como blanco en la región E6/E7 viral. El VPH se detectó en un 37,40% (153/409) de las pacientes, el 86 % (153/178), fueron virus de alto riesgo oncogénico de estos un 46,64% VPH tipo 18 (83/178) y VPH tipo 16 en el 34,28% (61/178). El 53,93% (96/178) de las pacientes presentaron infecciones múltiples.

La citología mostró cambios en el 15% de las pacientes positivas. Un 49,67% en mujeres positivas para la infección por VPH mostraron anomalías en el estudio colposcópico ( $p < 0,0019$ ). El 85% de las mujeres evaluadas eran menores de 45 años.

Cincuenta y siete pacientes fueron evaluados 15 meses consecutivos después del estudio base. Este grupo de seguimiento tenía una prevalencia inicial de morbilidad 49,12% (28/57) y al final del seguimiento un 10,53%. En este punto final de seguimiento se demostró que el 89,29% (25/28) de las mujeres eran negativas para la infección por VPH-AR, 10,34% (3/28) mostró persistencia de la infección, 17,54% (10/57) presentó alteraciones citológicas, con 80% de positividad para el VPH, y una regresión del 100% (10/10) de las lesiones previamente identificadas.

La tasa de incidencia fue del 4,23% (3/71), lo que equivale a 4,23 nuevos casos de infección por VPH por cada 100 personas, por año de seguimiento. En conclusión, este trabajo mostró una alta frecuencia de infección por VPH de alto riesgo, con predominio de VPH-18 y 16 y en general se presentaron infecciones múltiples en una misma paciente. La colposcopia tuvo mejor valor predictivo para la infección con VPH que la prueba de Papanicolaou. El estudio de seguimiento reveló un bajo porcentaje de infección persistente, y una alta frecuencia de negatividad para la infección viral, alta regresión de lesiones citológicas y colposcópicas, una baja tasa acumulada y una incidencia similar a la reportada por otros países de América Latina y superior a la de los países europeos. Además es el único estudio realizado en Venezuela en el cual se ha logrado un seguimiento longitudinal para la infección por VPH.

**VPH y patología vulvar:** El condiloma acuminado es una de las enfermedades más comunes de transmisión sexual alrededor del mundo. Estas lesiones están asociadas con la infección por los tipos

de VPH 6 y 11 de bajo riesgo oncogénico. En nuestro país, la prevalencia de la infección por estos virus es alta (65 %), razón por la cual Ávila *et al.* (2018) determinaron la presencia de VPH mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en un grupo de pacientes que presentaban condilomas acuminados en el área vulvar. De las 90 biopsias evaluadas, de pacientes con infección sugestiva por el VPH, 72 (80 %) correspondieron a condilomas acuminados según el diagnóstico histopatológico, y el 20% presentaron otras patologías. La infección por el VPH se detectó en los 72 condilomas acuminados, observándose con mayor frecuencia el tipo 6 (54,2 %), seguido del tipo 11 (36,1 %); tres casos (4,2 %) presentaron coinfección con los tipos 6 y 11 y en cuatro casos (5,6 %) no se logró tipificar. Los resultados mostraron una clara vinculación entre los tipos de VPH-6 y 11 de bajo riesgo oncogénico y el desarrollo de las verrugas genitales, a diferencia de las neoplasias intraepiteliales.

Pulido *et al.* (2011) con la finalidad de conocer las características clínicas y epidemiológicas de las pacientes con infección por VPH que acudieron a la consulta de patología vulvar del Instituto de Biomedicina, revisaron los datos registrados en las historias clínicas de estas pacientes, en el período comprendido entre enero 2004 y septiembre 2009. De 248 historias, se tomaron 98 (39,5%) con diagnóstico de infección por VPH, las cuales fueron el objeto de estudio. Predominó el grupo etario entre 21 y 30 años (25,5%), de ocupación oficios del hogar (45,9%), solteras (50%) y procedentes del Distrito Capital. El 11% de estas pacientes se encontraban embarazadas para el momento del diagnóstico y 23% en tratamiento con esteroides e inmunosupresores sistémicos. El promedio de sexarquia fue 18,8 años (rango 12 - 42 años). El motivo de consulta más frecuente fue la presencia de lesión (71%), seguido de prurito (10%), evidenciándose al examen clínico pápulas verrugosas en el 47,8%, de localización predominante en labios mayores (40,7%) ( $p < 0,05$ ). Se practicó biopsia de piel confirmatoria en el 38% de los casos y detección del VPH por PCR en el 61% de los casos, reportándose positiva en el 63,3%, con identificación del genotipo

viral tipo 6 de bajo riesgo oncogénico en el 57,9%, seguido del genotipo 11 (23,7%) de mediano riesgo y el tipo 16 de alto riesgo oncogénico (5,3%). El tratamiento fue combinado en la mayoría de los casos (20,4%): criocirugía (17,3%) y ácido tricloroacético (16,3%). El dermatólogo cuenta con estas herramientas moleculares para el diagnóstico precoz de esta patología asociada a VPH.

### **VPH e infecciones de transmisión sexual**

Las ITS son un problema social, económico, cultural y médico. Se diferencian claramente de otras enfermedades transmisibles y producen secuelas que solo son características de ellas. En un estudio multidisciplinario en el cual participaron las Universidades del Zulia, Los Andes, Carabobo, Oriente y Central de Venezuela, se abordaron distintos aspectos de las infecciones de transmisión sexual entre ellas VPH, donde además se investigó respecto a los conocimientos sobre este tema en la población general y juvenil. Correnti *et al.* (2012) expusieron los resultados de este estudio en distintas regiones del país. Inicialmente se determinó que en todas las regiones estudiadas, la infección más frecuente fue la de VPH, seguida de *Chlamydia* y Herpes. En la Gran Caracas y Cojedes se detectó la presencia de sífilis en mujeres jóvenes.

La detección de VPH demostró que en la Gran Caracas el virus estuvo presente en 59% de la población estudiada; en Cumaná se detectó 46,3% de mujeres infectadas y en Cojedes, 40%. En Zulia la positividad fue de 36,5% y en Mérida de 21,6%.

Se estableció una red de centros de investigación preparados tecnológicamente para la detección temprana de ITS, y su participación en programas conjuntos de prevención con los entes gubernamentales de salud y educación.

En este estudio se diseñó y validó un instrumento que permitió determinar que la edad de inicio de la actividad sexual en esta población de jóvenes estaba entre 13 y 21 años. Esto indica que deberían comenzarse en la escuela primaria los esfuerzos de educación sexual y de prevención de enfermedades trasmisibles. Los medios más comunes para la obtención de la información sobre ITS fueron los

padres, las aulas de clases y la televisión. Esto señala que es sumamente importante llevar a cabo un programa de información y capacitación sobre ITS dirigido a padres y maestros, orientado a eliminar mitos y creencias erradas sobre la sexualidad infantil y juvenil.

Las infecciones de transmisión sexual más conocidas según el instrumento son: VIH, VPH, herpes genital y *Chlamydia*, por lo que un énfasis especial debe realizarse en los métodos para su prevención. Sin embargo, se observó un fuerte desconocimiento sobre las características de dichas enfermedades y acerca de los métodos de protección adecuados en cada caso.

Se requiere reforzar el uso de los métodos de prevención, ya que un gran número de personas manifestó no usarlos o haberlos usado esporádicamente, aun teniendo la información al respecto. Es necesario hacerlos más accesibles a la población y profundizar en la información sobre su uso, así como en la explicación de sus cualidades y aplicaciones a través de campañas publicitarias y educativas.

También es necesario, separar con mayor énfasis las funciones de prevención de embarazo y las de prevención de ITS, y apuntalar la importancia de la comunicación de la pareja para llevar a cabo una adecuada planificación familiar, lo que reduciría el número de madres y/o padres solteros, adolescentes, niños abandonados y otros problemas relacionados. En conclusión, estos datos brindan herramientas específicas para desarrollar campañas, programas de prevención y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual, para aclarar el panorama en cuanto a la población de riesgo, los medios a través de los cuales es más efectivo el mensaje y el tipo de mensaje que debe transmitirse en función de las necesidades de la población. Todo ello relacionado con la generación de planes adaptados a la realidad venezolana.

### **Metodologías moleculares para la detección de VPH**

Otro tema importante que el grupo multidisciplinario ha abordado, es la evaluación y desarrollo de distintos métodos de diagnóstico

molecular, para la detección y estudio de genotipos de VPH. La gran variedad de estuches comerciales de VPH en el mercado (Poljak *et al.* 2015), complica la elección de la mejor prueba para los programas de detección del cáncer de cuello uterino. Sólo se deben utilizar pruebas de VPH clínicamente validadas que demuestren una sensibilidad reproducible y consistentemente alta (Ronco *et al.* 2015). Por lo tanto, la gran mayoría de los ensayos de VPH disponibles en el ámbito comercial siguen siendo inadecuados para la detección porque no hay evaluaciones de rendimiento válidas en la literatura revisada por pares. A partir de julio de 2019, solo 15 ensayos del VPH cumplen con los criterios de directrices de consenso internacional para la detección del cáncer de cuello uterino primario.

Las pruebas basadas en la detección de ADN del VPH han demostrado ser una herramienta muy útil para el cribado y el seguimiento de infecciones cervicales. Michelli *et al.* (2011) compararon tres métodos para la detección de ADN del VPH junto con el análisis de la citología y colposcopia. Se recogieron muestras cervicales de 100 mujeres sexualmente activas en Mérida, en el oeste de Venezuela. La infección por VPH se examinó utilizando ensayos Híbrido de Captura 2 (HC2), L1-Nested-PCR y E6/E7-PCR en tiempo real. El 40% de las muestras (40/100) fueron positivas por el VPH al menos por uno de los métodos de detección. La prueba de HC2 detectó VPH en 12% de las muestras. Los PCR L1 y E6/E7 mostraron una sensibilidad del 50% y una especificidad del 77%. La tasa de concordancia entre HC2 y ambos ensayos fue del 65%. El valor de Cohen Kappa mostró una concordancia moderada entre HC2 y ambos métodos de PCR (0,55; CI 95%). También se evidenció una concordancia moderada cuando se compararon los PCR L1- y E6/E7 (=0,48 s; CI 95%). Hubo una asociación significativa entre la prueba de Schiller y E6/E7-PCR (p=0,006) para la infección por el VPH.

Existe una concordancia aceptable entre los tres ensayos para la detección del VPH. Sin embargo, es necesario analizar más a fondo los diferentes formatos de PCR para elegir el método correcto para las pruebas de VPH. Estas investigaciones fueron posibles ya que

previamente se realizaron dos trabajos previos para diseñar y evaluar el sistema de PCR en tiempo real, con el objetivo de ser empleado para la detección, genotipificación, carga viral y lo más importante; la inserción del genoma viral en el ADN humano como marcador de progresión. (Michelli *et al.* 2010, Jurguensen *et al.* 2010).

## DISCUSIÓN

Las distintas investigaciones en las cuales ha participado el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, permitió consolidar un grupo de trabajo científico en el área de la infección causada por el virus de Papiloma Humano. Es importante destacar que el Laboratorio de Microbiología Molecular no solo representa un laboratorio de investigación sino que realiza labores de servicio a los pacientes que acuden a la institución y otros centros públicos asociados; hasta el momento se han procesado unas dos mil muestras para el diagnóstico molecular y la tipificación del virus. Las muestras, principalmente, han sido provenientes de pacientes que acuden al Servicio de Dermatología del Instituto, así como también de los Servicios de Ginecología y Urología del Hospital Vargas y la Unidad de ITS del Hospital Universitario de Caracas. En este contexto, el laboratorio da respuesta de diagnóstico molecular en la detección y genotipificación del virus, lo cual contribuye de manera invaluable en el diagnóstico preciso, así como en la orientación del tratamiento y seguimiento del paciente infectado.

El grupo de investigación se ha orientado desde su constitución, en los estudios de agentes infecciosos relacionados con lesiones neoplásicas de distintas índole. Además, participa activamente en las actividades docentes institucionales y universitarias. La breve sinopsis de la trayectoria del grupo orientada principalmente al virus papiloma humano, deja en claro que es posible analizar muestras biológicas de todo tipo para la búsqueda viral, los resultados indican que en Venezuela los VPH de alto riesgo que mayormente circulan en pacientes con lesiones intraepiteliales del CU son el VPH-16 y VPH-18 y que

los VPH de bajo riesgo como el 6 y el 11 se presentan con mayor frecuencia en lesiones vulvares.

Lo más importante en el contexto del grupo de investigación es su permanencia en el tiempo, las interrelaciones con instituciones universitarias públicas y privadas, el acompañamiento en estudios de campo en población joven susceptible a sufrir estas infecciones, el interés en la labor educativa y de formación y apertura a participar en grupos multidisciplinarios.

## CONCLUSIONES

El Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, ejerce sus funciones de investigación, docencia y servicio desde hace más de 23 años.

Ha participado en distintos proyectos de investigación a nivel nacional e internacional en el área de microorganismos asociados a cáncer.

El grupo de investigación ha sabido establecer alianzas estratégicas con varias Universidades y otras instituciones en el país para abordar la problemática del cáncer del cuello uterino y su relación con el virus de Papiloma Humano.

## REFERENCIAS

- ALI F., KUELKER R., WASSIE B., (2012). "Understanding cervical cancer in the context of developing countries". *Ann Trop Med PH* 5(1): 3–15.
- AVILA M., CAVAZZA ME., VÁSQUEZ W., ORTEGA J., LÓPEZ Y., CORRENTI M., (2008). "Genotipificación del virus papiloma humano en pacientes con de condilomas acuminados". *Rev Soc Ven Microbiol* 28 (2).
- CAPOTE L. (2015)., "Epidemiology of cervical cancer in Latin America". *El cancer medical science.* 9:577.
- CERVICA CANCER: and NCD we can overcome. *Intercontinental Hotel, Geneva.* 19 May 2018. Disponible en: [https://www.who.int/reproductivehealth/DG\\_Call-to-Action.pdf](https://www.who.int/reproductivehealth/DG_Call-to-Action.pdf) [Consultado: 1 de mayo 2020].
- CORRENTI M., RIVERA H., CAVAZZA ME., (1999). "Detection of Human Papillomavirus in oral squamous cell carcinomas in a venezuelan population". *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 88(2): 208.

- CORRENTI M., MEDINA F., CAVAZZA ME., RENNOLA A., AVILA M., FERNANDEZ A., (2011). "Human papillomavirus (HPV) type distribution in cervical carcinoma, low-grade, and high-grade squamous intraepithelial lesions in Venezuela women". *Gynecologic Oncology* 121, 52–531.
- CORRENTI M., CAVAZZA ME., TÉLLEZ L., CALLEJAS D., ÁVILA M., PLATA G., (2012). "Evaluación de las Infecciones de Transmisión Sexual en cinco regiones de Venezuela". *Revista Nuestra América*. Edición 3. Disponible en: [http://revistanuestreamerica.net/content/site/module/magazine/op/article/article\\_id/27/format/print/](http://revistanuestreamerica.net/content/site/module/magazine/op/article/article_id/27/format/print/)
- DE MARTEL C., FERLAY J., FRANCESCHI S., VIGNAT J., BRAY F., et al., (2012). "Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis". *The Lancet Oncology* 13(6): 607–615.
- IBÁÑEZ R., AUTONELL J., SARDÀ M., CRESPO N., PIQUE P., PASCUAL A., et al., (2014). "Protecting the under screened women in developed countries: The value of HPV test". *BMC Cancer* 14(1); 574.
- JIMENEZ C., CORRENTI M., SALMA M., CAVAZZA M.E., PERRONE M., (1998). "Detection of Human Papillomavirus (HPV) in benign lesions of the oral cavity". *International Dental Journal* 48:(5) 385–8.
- JURGENSEN C., VIELMA S., MICHELLI E., TELLEZ L., MENDOZA J., MUÑOZ et al., (2010). "Viral load and genome integration detection: Two molecular markers for HPV persistent infection". *International Journal of Infectious Diseases* 14, e475–e476.
- MICHELLI E., TÉLLEZ L., MENDOZA JA., JÜRGENSEN C., MUÑOZ M., PÉREZ S., et al., (2011). "Comparative analysis of three methods for HPV DNA detection in cervical samples". *Investigación Clínica* 52(4): 344–357.
- MICHELLI E., TELLEZ L., MENDOZA J., JURGENSEN C., BOTELLO W., CORRENTI M., et al., (2010). "Amplification of early genes of Human Papilloma Virus targeting nine virus genotypes. Mérida, Venezuela". *International Journal of Infectious Diseases* 14, e474.
- MOYA SJ., PIO DL., (2014). "Prevalence of cervical- uterine abnormalities associated with poverty levels at Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolome between 2011- 2013". *Rev Invest Univ Norbert Wiener* 3, 89–99.
- NORRILD B., *The 22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop*. (2005). "Highlights from the molecular biology sessions". *Papillomavirus Report*. 2005; 16:203-5.
- PARKIN DM., PISANI P., FERLAY J., (1999). "Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990". *International Journal of Cancer* 80(6): 827–841.
- POLJAK M., (2015). "Towards cervical cancer eradication: Joint force of HPV vaccination and HPV-based cervical cancer screening". *Clinical Microbiology and Infection* 21(9): 806–807.
- POLJAK M., KOCJAN BJ., OSTRBENK A., SEME K., (2016). "Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV)". *Journal of Clinical Virology*, 76(Suppl 1), S3–S13.
- PULIDO AM., ANGULO AG, ÁVILA M, CAVAZZA ME., CRESPO L., VÁSQUEZ W., et al., (2011). "Infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) en mujeres: Características epidemiológicas, clínicas y patológicas". *Dermatol Venez* 49 (3-4).
- DE LA HOZ RESTREPO F., ALVIS GUZMAN N., DE LA HOZ GOMEZ A., RUIZ C., (2017) "Policies and processes for human papillomavirus vaccination in Latin America and the Caribbean". *Rev Panam Salud Publica* 41,1-8.
- RONCO G., ARBYN M., MEIJER CJLM., SNIJDERS PFJ., CUZICK J., (2015). "Screening for cervical cancer with primary testing for human papillomavirus, S1" in: Anttila A, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. (eds.), *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening, Second edition –Supplements*. Office for Official Publications of the European Union, Luxembourg.
- SIMMS K T., STEINBERG J., CARUANA M., SMITH, MA., LEW JB., SOERJOMATARAM I., et al., (2019) "Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020-99: A modelling study". *The Lancet Oncology* 20(3), 394–407.
- TÉLLEZ L., MICHELLI E., MENDOZA J. A., VIELMA S., NOGUERA M. E., CALLEJAS D., et al., (2015). "Persistent infection with high-risk human papilloma viruses: Cohort study, Mérida, Venezuela". *Ecancer medical science*, 9, 579.
- URRÚTIA G., BONFILL X., (2010). Declaración PRISMA: "Una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y meta-análisis". *Medicina Clínica* 135(11), 507–511.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a todos y cada uno de los pacientes que han participado voluntariamente en los

distintos estudios sobre la problemática de Virus de Papiloma Humano en el País.

A nuestra técnica histotecnóloga Sra. Yadira Ascanio por acompañarnos a lo largo de todos estos años de búsqueda científica y personal.

# Innovación biológica en productos para el diagnóstico: un aporte al desarrollo sostenible de la salud en Venezuela

**Diana Ortiz-Princz<sup>1,2</sup>**  
dprincz@gmail.com

**Rosabel González<sup>1</sup>**  
rosagoma@hotmail.com

**María Argelia Polegre<sup>1</sup>**  
mpolegre@gmail.com

**Primavera Alvarado<sup>1</sup>**  
prima558@gmail.com

**María Eugenia Cavazza<sup>1,2</sup>**  
cavazzaster@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Escuela de Medicina “Dr. José María Vargas”, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESUMEN

El Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, como resultado de años de experiencia e investigación, ha desarrollado productos biológicos para el diagnóstico de diferentes enfermedades tales como: la leishmaniasis, las micosis sistémicas, las infecciones entéricas producidas por bacterias y la infección por *Helicobacter pylori*. A lo largo de los años se ha conformado un equipo multidisciplinario de investigadores que conforman los diferentes laboratorios de: Bioquímica, Micología, Enfermedades Entéricas y Microbiología Molecular. Estos productos se desarrollaron inicialmente como parte del avance de las diferentes líneas de investigación en cada uno de los laboratorios y actualmente, cumplen con el objetivo de dar respuesta a la demanda de diagnóstico de estas enfermedades endémicas de gran importancia en Venezuela. Contribuyendo de esta manera con la investigación, la academia, la formación de nuevos talentos y planteando la innovación como un proceso productivo y sostenible de nuestro país.

**Palabras clave:** Leishmanina; micosis sistémicas; diarreas; *Helicobacter pylori*; diagnóstico.

## BIOLOGICAL INNOVATION IN PRODUCTS FOR DIAGNOSIS: A CONTRIBUTION TO THE SUSTAINABLE DEVELOPMENT OF HEALTH IN VENEZUELA

### ABSTRACT

The Institute of Biomedicine “Dr. Jacinto Convit”, throughout his scientific experience, has developed biological products for the diagnosis of different diseases such as: leishmaniasis, systemic mycoses, enteric infections caused by bacteria and *Helicobacter pylori* infection. Over the years, a multidisciplinary team of researchers

has been formed that make up the different laboratories of: Biochemistry, Mycology, Enteric Diseases and Molecular Microbiology. These products were initially developed as part of the advancement of the different lines of research in each of the laboratories and currently with the objective of responding to the demand for diagnosis of these endemic diseases of great importance in Venezuela. Contributing in this way with research, the academy, the training of new talents and proposing innovation as a productive and sustainable process in our country.

**Keywords:** Leishmanina; systemic mycosis; diarrhea; *Helicobacter pylori*; diagnosis.

## INTRODUCCIÓN

El Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” tiene una amplia trayectoria en el estudio de diversas enfermedades que afectan a la población venezolana. A lo largo de los años se ha conformado un equipo de investigación cuya trayectoria profesional fue influenciada por su fundador y director; el Dr. Jacinto Convit. En la búsqueda de aportar soluciones a los problemas de salud pública, este equipo ha desarrollado productos biológicos para el diagnóstico de algunas enfermedades endémicas de gran importancia en Venezuela como lo son: la leishmaniasis, las micosis, las diarreas entéricas y la infección por *Helicobacter pylori*. Estos productos han sido elaborados a partir de cepas autóctonas, por lo que son altamente específicos para los pacientes en Venezuela. Además, al ser producidos en el país se garantiza su accesibilidad y bajo costo. El enfoque del equipo está fundamentado en la máxima optimización de los espacios y las funciones, para lograr generar estos productos con altos estándares de calidad, orientados a satisfacer la gran necesidad de diagnóstico de distintas endemias en el país, con la visión a futuro de abastecer los servicios de salud a nivel nacional y así ofrecer estas pruebas de diagnóstico a toda la población.

## LEISHMANINA: SU IMPORTANCIA COMO PRUEBA DE DIAGNÓSTICO

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por un protozoo parásito del género *Leishmania*, que es transmitido a través de la picadura de flebótomos infectados. La infección se presenta como un espectro clínico que puede ir desde lesiones ulcerativas en el lugar de la picadura, hasta la producción de un compromiso visceral diseminado que puede causar la muerte. Este rango de manifestaciones, ha permitido describir tres formas clínicas principales de leishmaniasis: la visceral (la forma más grave de la enfermedad, a menudo conocida como enfermedad de kala-azar), la cutánea (más frecuente) y la forma mucocutánea (Convit *et al*, 1993).

Esta enfermedad afecta a las poblaciones más pobres del planeta, está asociada a diversos factores ambientales, la malnutrición, los desplazamientos de poblaciones, las malas condiciones de vivienda, la falta de recursos económicos y la debilidad del sistema inmunitario (Convit, 1974; Convit, 2005).

El último reporte sobre el estado de la infección por leishmaniasis en Venezuela, correspondiente al año 2017, muestra un incremento significativo en el número de casos de leishmaniasis cutánea y mucosa en el país. El informe reporta que durante este año se registraron 2.326 casos nuevos, con una incidencia de 11,26 por 100.000 habitantes (OPS, 2019). Esta importante incidencia impulsa la necesidad de contar con pruebas que permitan un diagnóstico eficiente y oportuno de la infección.

El diagnóstico de la Leishmaniasis está basado en cuatro criterios fundamentales: clínico, epidemiológico, inmunológico y parasitológico. La Leishmanina o Prueba de Montenegro (IDR) es una de las pruebas de diagnóstico más utilizadas y consiste en la inoculación por vía intradérmica en el antebrazo de una suspensión de 0,1 mL de antígeno de promastigotes de *Leishmania* muertos por calor en una concentración de  $6,25 \times 10^6$  promastigotes por mL. Esta prueba es de reconocida utilidad en estudios epidemiológicos y como apoyo en el diagnóstico diferencial de la leishmaniasis tegumentaria ya que permite evaluar la inmunidad mediada por células a través de la reacción de hipersensibilidad (Furuya *et*

al, 1989). La lectura de la Leishmanina, se realiza a las 48 horas posteriores a la inoculación, utilizando la técnica del bolígrafo, y su interpretación en el país se efectúa según los criterios establecidos por el Programa Control de la Leishmaniasis en Venezuela (MPPS 2019), considerando positiva la reacción cuando el diámetro de la induración (consecuencia de la estimulación celular) es de 10 mm o más.

La Leishmanina es una alternativa en el diagnóstico presuntivo y diferencial de la leishmaniasis, siendo ampliamente utilizada por el bajo costo de su producción y por la facilidad de su aplicación e interpretación, sobre todo en el medio rural donde se encuentran los mayores porcentajes de personas afectadas. En este sentido, cabe destacar que el Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” a lo largo de la historia ha realizado grandes esfuerzos formando al personal de salud tanto a nivel local como a nivel de los diferentes Servicios de Dermatología Sanitaria del país.

Desde el año 1984 en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, se elabora la Leishmanina, siendo que su producción y utilización se ha mantenido en el tiempo, cumpliendo así con el legado de la labor del Dr. Jacinto Convit quien desde sus inicios dirigió su producción y dejó, de manera innegable, grandes contribuciones en el estudio de la leishmaniasis en Venezuela (Convit *et al.*, 1987; Convit *et al.*, 2004).

La Leishmanina elaborada en el Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” es un antígeno producido con la especie de *Leishmania mexicana pifanoi* (LEM 279), tipificada por el Centro Nacional de Referencia de Leishmaniasis, Laboratorio de Parasitología del Dr. Jean-Pierre Dedet en Montpellier Francia, bajo el código de identificación:

CNRL Code:LEM 279

WHO Code: MHOM/VE/57/LL1

TAXON: *Leishmania Pifanoi*

ZYMODEME: MON-40

Para su producción, los ejemplares del parásito *Leishmania* se crecen en medio de cultivo suplementado con nucleótidos, vitaminas, y antibióticos. Los promastigotes son recogidos en su

fase logarítmica, son resuspendidos y envasados en viales certificados, para posteriormente ser inactivados por calor (Pan, 1984). En cada fase, son realizados los correspondientes controles de esterilidad para verificar la ausencia de bacterias, hongos y micobacterias, así como también los ensayos de inocuidad para probar toxicidad.

La Leishmanina contribuye sin duda, en una manera fácil, económica y eficiente al diagnóstico presuntivo de la enfermedad, que junto a otros métodos directos que evalúan la presencia del agente causal, coadyuvan a su diagnóstico definitivo. Por tanto, potenciar el desarrollo y producción de la Leishmanina aporta beneficios indiscutibles en la población afectada por esta enfermedad.

### **DESARROLLO DE ANTISUEROS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DIARREAS BACTERIANAS**

La diarrea aguda infantil continúa siendo la segunda causa de muerte en la población menor de 5 años; 499.000 niños fallecen por diarrea anualmente en el mundo, representando esta cifra el 8,6% de las muertes por todas las causas en este grupo de edad (GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017). Venezuela, no escapa a esta problemática; para el año 2016 la diarrea aguda resultó ser la tercera causa de consulta, con 2.208.623 eventos en toda la población. De este total, 38,7% (853.698 casos) correspondieron a la población menor de 5 años, observándose además en este grupo de edad, un incremento de 187.310 casos con respecto al año 2015 (Boletín Epidemiológico MPPS, 2017).

Entre las bacterias que causan diarrea aguda infantil, *Escherichia coli enteropatógena* (ECEP) es una de las más importantes en el mundo, registrándose la mayor frecuencia de la infección en la población menor de 2 años, disminuyendo considerablemente el número de infecciones con la edad (Lanata *et al.*, 2017). Se estima que EPEC es responsable del 5-10% de las diarreas pediátricas en países en desarrollo como Brasil, Chile, Perú e Irán (Lanata *et al.*, 2017, Gómez *et al.*, 2016). En Venezuela, los trabajos realizados muestran igualmente el impacto de la infección por ECEP en la población infantil, reportando en algunos casos, como en Caracas y el

estado Sucre frecuencias superiores al 30% (González *et al.*, 2018; Michelli *et al.*, 2016).

Una de las metodologías utilizadas para la identificación de ECEP es la seroagrupación, mediante la utilización de sueros polivalentes que evidencian la presencia de los antígenos somáticos "O". Sin embargo, la adquisición de estos sueros en el mercado es de alto costo, debido a que son productos importados.

De manera que la alta frecuencia de ECEP en la población infantil con diarrea aguda y el elevado costo de los estuches de diagnóstico, justifican la búsqueda de alternativas que permitan la adecuada y oportuna identificación del patógeno.

El Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" (SAIB), a partir del año 2010, inició la producción de sueros polivalentes para la identificación de cepas ECEP aisladas de muestras de heces. La concepción del producto consiste en la obtención de sueros polivalentes, elaborados a partir de cepas de referencia y que mediante la técnica de aglutinación en lámina permitan la rápida identificación del patógeno.

El estuche de diagnóstico consiste de tres polivalentes que permiten la identificación de la ECEP, mediante la detección de los antígenos somáticos "O". Cada estuche de diagnóstico está compuesto por tres polivalentes: polivalente I (factores O26, O55, O88), polivalente II (factores O119, O125, O126) y polivalente III (factores O114, O142, O158). Cada polivalente fue evaluado internamente mediante la prueba de aglutinación en lámina y siguiendo los criterios del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC 2003). Para esto se utilizaron cepas controles positivos (cepas homólogas de referencia) y controles negativos (cepas heterólogas de referencia) suministradas por Instituto "Adolfo Lutz"-Brasil y por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

Los tres polivalentes presentaron una sensibilidad del 100%. Mientras que, la especificidad del polivalente I fue del 83% y la de los polivalentes II y

III del 97%. Estos resultados muestran la óptima y alta especificidad de estos los polivalentes contra ECEP.

Posterior a la realización de las pruebas de sensibilidad, especificidad y estabilidad, se donaron pequeños lotes de estos sueros al Laboratorio de Microbiología del Hospital Vargas en donde fueron probados con resultados muy satisfactorios. De igual forma los sueros se han utilizado en varias tesis de grado; los resultados de una de estas tesis ya se han publicado (González *et al.*, 2018).

Debido a la alta frecuencia de ECEP en los casos de diarrea infantil en nuestro país, la producción de los sueros aglutinantes para la identificación del patógeno es de gran importancia, siendo además que, por los momentos, representan la única oferta a nivel nacional, tienen una alta sensibilidad y especificidad y reducen considerablemente los costos de adquisición.

La producción de sueros aglutinantes para la identificación de ECEP, permitirá la identificación rápida y oportuna del patógeno lo que facilitará la aplicación de un tratamiento adecuado. De igual forma, se verá beneficiada la vigilancia epidemiológica de la enfermedad lo que llevará al desarrollo de medidas de prevención e intervención oportunas.

### **ANTÍGENOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MICOSIS PROFUNDAS**

Venezuela tiene una ubicación geográfica privilegiada, ocupando una posición muy importante entre los países de América Latina (Albornoz 1996). Las características climatológicas y territoriales favorecen el desarrollo abundante de la flora, así como también de los agentes causales de las micosis profundas sistémicas, por lo que la incidencia de las enfermedades producidas por ellos, son de gran importancia en la salud pública (Pérez *et al.*, 2000). Las micosis sistémicas, como la Histoplasmosis, Paracoccidiodomicosis y Aspergilosis están presentes en nuestro país, y se adquieren por inhalación. Actualmente, se requiere métodos de diagnóstico rápidos, de alta sensibilidad y especificidad y que contribuyan al conocimiento de su epidemiología. En este sentido, se han reportado, más de 1.600 casos anuales de micosis profundas que afectan a la

población rural y urbana del país, siendo *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides posadasii* y *Aspergillus* spp los agentes causales más frecuentes (Vera *et al.*, 2007, Martínez *et al.*, 2013). La histoplasmosis es causada por *Histoplasma capsulatum*, posee una distribución mundial y se ha encontrado en los cinco continentes (Wheat *et al.*, 2016). Por otro lado, la paracoccidioidomicosis, es una micosis sistémica, exclusiva de América Latina, es la primera micosis profunda en pacientes inmunocompetentes, es producida por *Paracoccidioides brasiliensis* y se caracteriza por estar asociada a la población rural (Cermeño *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2013). Su diagnóstico tardío puede producir la muerte o conllevar a una importante fibrosis pulmonar (Da Silva *et al.*, 2016).

La aspergilosis, es una micosis oportunista que afecta principalmente a individuos inmunocomprometidos (Vera *et al.*, 2007). Es causada por *Aspergillus* spp, los cuales son hongos saprofitos y ubicuos, de distribución universal. En los últimos años, se observa un notable aumento de las infecciones micóticas, debido principalmente, a las condiciones socio-económicas de la población de las áreas endémicas de los países de Sur América, además, también se ha elevado el número de coinfecciones asociadas a micosis tales como: Tuberculosis y VIH. (Falci *et al.*, 2019). En este sentido, el estudio micológico es certero y oportuno para el diagnóstico de estas micosis, pero el resultado tarda entre 15 a 30 días, mientras que el diagnóstico serológico, empleando antígenos fúngicos de producción endógena con cepas autóctonas, permite en una semana, un resultado que aunado a los parámetros clínicos, conforma un diagnóstico certero.

El laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, ha venido desarrollando y caracterizando antígenos fúngicos para el diagnóstico de las micosis profundas localizadas y sistémicas desde los años 70, los métodos de producción fueron inicialmente tomados de trabajos de autores con experiencia en el área. Estos métodos se fueron adaptando y elaborando con

cepas autóctonas, obtenidas de los pacientes afectados con cada una de las micosis. Se ensayaron cepas y técnicas hasta ir obteniendo reactivos de mayor calidad diagnóstica, comprobado su eficacia, especificidad y sensibilidad por diversas técnicas, a la par del diagnóstico micológico de rutina que siempre sustenta el estudio del paciente. Estos antígenos fúngicos, obtenidos de cepas autóctonas y sus respectivos antisueros específicos, permiten el diagnóstico de las micosis profundas y subcutáneas endémicas del país, a través del serodiagnóstico (Mendoza *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2001).

Hasta la fecha, estos reactivos se han elaborado a pequeña escala, por lo que no se pueden ofrecer de manera extensiva para ser distribuidos a nivel nacional a los múltiples centros de salud pública, donde son ampliamente requeridos. Viéndose éstos obligados (en el mejor de los casos) a adquirirlos de laboratorios comerciales, lo cual implica un alto costo, o en su defecto, prescindir de ellos. La elaboración en el país, a gran escala de los antígenos fúngicos con cepas autóctonas, permitiría su distribución de manera eficaz y segura, a los centros de salud públicos especializados en el diagnóstico de las patologías fúngicas.

Además del diagnóstico, estos reactivos pueden servir de base para otros estudios de investigación, como la creación de cebadores moleculares para el diagnóstico molecular, desarrollo de futuras vacunas y tratamientos, permitiendo experimentar y desarrollar otras técnicas de diagnóstico serológico, de mayor sensibilidad y especificidad como por ejemplo la técnica de ELISA, la cual hasta la fecha, no está implementada en ningún centro de salud de nuestro país (Alvarado *et al.*, 2015; Alvarado *et al.*, 2020).

Principalmente, el desarrollo de estos reactivos en el país, brinda la oportunidad de poder crear y cubrir nuestras propias necesidades y requisiciones a costos factibles para el diagnóstico de las micosis endémicas y oportunistas que afectan a la población venezolana.

## **INMUNODIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori* Y SUS FACTORES DE VIRULENCIA**

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria que coloniza la mucosa gástrica y se estima que más del 50% de la población mundial está infectada con esta bacteria, siendo que en países sub desarrollados la tasa de infección en la población sobrepasa el 80% (Zamani *et al.*, 2018). La persistencia de la infección con *H. pylori* puede ocasionar el desarrollo de diversas patologías como gastritis, ulcera gástrica o duodenal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) y adenocarcinoma gástrico; por lo que es considerado el primer agente etiológico para la mayoría de los desórdenes gastroduodenales siendo declarado como agente carcinógeno humano tipo I en 1994, por la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional del Cáncer (IARC, 1994). La infección por *H. pylori* induce un proceso inflamatorio que produce gastritis crónica, la cual puede permanecer asintomática durante años o evolucionar desde una gastritis no atrófica a patologías gástricas severas (Correa 2012), es por ello que existe consenso a nivel mundial sobre la importancia de su diagnóstico y erradicación, la cual ha sido planteada como estrategia para la prevención de cáncer gástrico en el mundo (Malfertheiner *et al.*, 2017).

*H. pylori* tiene alta variabilidad genética y sus genes *cagA* y *vacA* le confieren mayor virulencia, siendo las cepas *cagA+* las que están asociadas con mayor cronicidad de la infección, patologías gástricas severas y desarrollo de cáncer gástrico (Correa *et al.* 2012). En Venezuela, la infección gástrica por *H. pylori* es de alta prevalencia en niños y adultos, los estudios han demostrado que más de la mitad de la población está infectada, siendo que el 50% de los infectados lo están por cepas *cagA+* (Bohórquez *et al.*, 2010; Cavazza *et al.*, 2004; Ortiz-Princz *et al.*, 2003; Ortiz-Princz *et al.*, 2016), por otro lado, nuestro país tiene una alta incidencia de cáncer gástrico, con énfasis en la zona Andina.

El diagnóstico de la infección es complejo, principalmente por la descrita inconsistencia entre las diferentes pruebas de diagnóstico disponibles, dicha inconsistencia está determinada por las diferencias de

sensibilidad y especificidad, la calidad y precisión de la toma de muestra, la experticia del evaluador (examen histológico) y el tipo de prueba de diagnóstico utilizada. En general, las pruebas no invasivas están conformadas por la prueba de Carbono radiactivo ( $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$ ) también conocida como la prueba del aliento, la detección de antígenos en heces y la serología. De éstas, la primera es considerada la prueba de oro. Ninguna de las dos primeras detecta el tipo de cepa de acuerdo a sus factores de virulencia. Existen algunos estuches comerciales serológicos que detectan anticuerpos anti CagA, sin embargo ninguno de estos productos son elaborados en el país por lo que sus costos son muy elevados y por lo tanto poco accesibles, sobre todo en poblaciones de bajos recursos. Por su parte, las pruebas invasivas requieren la toma de biopsias gástricas a partir de las cuales se puede realizar el cultivo, la examinación histológica, PCR y la prueba de ureasa rápida. Estas pruebas se fundamentan en la detección directa de la bacteria, sus genes o productos metabólicos.

Es indiscutible que existe una gran necesidad de disponer de pruebas que contribuyan al diagnóstico de la infección y que además éstas determinen los factores de virulencia de la cepa infectante que son de importancia clínica, que sean pruebas de alta sensibilidad y especificidad, de costos accesibles y que den respuesta a los requerimientos existentes en el país. Cabe destacar que el adecuado diagnóstico de la infección y la detección de los factores de virulencia que están asociados al desarrollo de lesiones pre neoplásicas y neoplásicas, son esenciales para un diagnóstico certero y oportuno, así como para el adecuado seguimiento del paciente infectado, lo cual contribuye a la prevención de la cronicidad de procesos inflamatorios que pueden derivar en el desarrollo de cáncer gástrico.

El Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, tiene una amplia trayectoria en la investigación de la infección por *H. pylori*, así como de otros agentes infecciosos. Desde sus inicios, nuestro grupo de investigación trabajó en conjunto con el Laboratorio de Microbiología, donde bajo la orientación de la Dra.

**Tabla 1:** Productos para el diagnóstico de enfermedades endémicas en Venezuela desarrollados en el Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit".

Producto	Infección que diagnostica el producto	Fundamento de la prueba	Agente / cepa	Prevalencia Nacional de la enfermedad
Leishmanina	Leishmaniasis	Antígeno para la evaluar reacción de hipersensibilidad.  (Prueba de Montenegro)	Leishmania	2.326 casos nuevos registrados para el año 2017*
Antisueros para el diagnóstico de diarreas bacterianas	Diarreas bacterianas producidas por ECEP	Antisueros para la detección de antígenos de ECEP.	Antígenos somáticos "O" de ECEP.  polivalente I (factores O26, O55, O88), polivalente II (factores O119, O125, O126) y polivalente III (factores O114, O142, O158).	30% de las diarreas infantiles son producidas por el agente**
Antígenos para el diagnóstico de micosis profundas	Micosis profundas	Antígenos para la detección de anticuerpos.	<i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Coccidioides posadasii</i> y <i>Aspergillus</i> spp.	1.600 casos anuales de micosis profundas
Estuche Inmunodiagnóstico para la infección por <i>H. pylori</i>	Infección por <i>H. pylori</i> .	Péptidos sintéticos para la detección de anticuerpos.	<i>H. pylori</i> , Ureasa y CagA	30-50% en niños 70-90% en adultos.  <i>cagA</i> : 50% de los infectados por <i>H. pylori</i> .†

\*OPS 2019

\*\*Datos reportados para Distrito Capital y Estado Sucre. González *et al.* 2018, Michelli *et al.* 2016 · Vera *et al.* 2007, Martínez *et al.* 2013.

† Bohórquez *et al.* 2010, Cavazza *et al.* 2004, Ortiz-Princz *et al.* 2013, Ortiz-Princz *et al.* 2016

Urrestarazu y su equipo se estandarizaron los métodos para aislar y cultivar en 1983, por primera vez en Venezuela, a *Campylobacter jejuni* y posteriormente a *H. pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes infectados (Vera 2008). A lo largo de su trayectoria, el Laboratorio de Microbiología Molecular ha desarrollado y ajustado protocolos para: el diagnóstico molecular de la bacteria y sus genes de virulencia, el diagnóstico microbiológico, estudios de susceptibilidad antibacterianos y preparación de antígenos para el desarrollo y estandarización de pruebas de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos, siempre en la búsqueda de herramientas que contribuyan a mejorar el diagnóstico de la infección.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una prueba diagnóstica basada en el diseño y síntesis de péptidos que permite determinar anticuerpos IgG séricos e IgA secretores en saliva específicos anti *H. pylori* y sus proteínas de virulencia, con lo cual es posible contribuir de esta manera al diagnóstico de esta infección, de una forma no invasiva. Resultados previos de nuestras investigaciones han mostrado que la detección de anticuerpos específicos anti *H. pylori* en saliva son un buen indicador de infección activa (Ortiz *et al.*, 2002), por lo que su determinación en este formato es un gran aporte para el diagnóstico de la infección.

Con el apoyo del Centro Nacional de Proteómica del Instituto de Medicina Tropical, en los Laboratorios de Química de Proteínas, Síntesis de Péptidos y la Sección de Biohelmintiasis (Noya *et al.*, 1998), se han diseñado secuencias de proteínas específicas de *H. pylori* utilizando herramientas de bioinformática y se han sintetizado estas secuencias peptídicas en fase sólida, lo cual nos ha permitido estandarizar pruebas de inmunodiagnóstico que determinan anticuerpos IgG séricos e IgA secretores en saliva, específicos anti péptidos de *H. pylori*, de CagA y otros factores de virulencia, en un formato de múltiples antígenos que permite evaluar varios péptidos de manera simultánea en la muestra de un paciente. Las pruebas han mostrado tener una alta sensibilidad y especificidad, la cual ha sido determinada utilizando como prueba de

oro la PCR y se han empleado en diversos protocolos de investigación, con el apoyo de los Servicios de Gastroenterología de diferentes centros de salud nacional.

Estas pruebas se desarrollan a costos accesibles, son relativamente sencillas de realizar, se pueden usar masivamente y son una excelente alternativa no invasiva que junto al criterio clínico, dan respuesta al diagnóstico y contribuyen: al tamizaje, al criterio de decisión del estudio endoscópico de vías digestivas superiores y pautas de tratamiento, teniendo además un gran valor epidemiológico.

El desarrollo de estas pruebas de diagnóstico para la infección por *H. pylori* y sus factores de virulencia, basada en péptidos sintéticos, nace como una necesidad de dar respuesta al diagnóstico eficaz y oportuno de esta infección que es de alta prevalencia en Venezuela y cuya detección temprana contribuye a la prevención del cáncer gástrico.

Un resumen de los productos para el diagnóstico de las distintas enfermedades endémicas en Venezuela desarrolladas en la institución, en el marco de este proyecto, se muestran en la tabla 1.

## **ESCALADA DE PRODUCCIÓN**

El desarrollo de los distintos productos para el diagnóstico de enfermedades endémicas en Venezuela aquí expuestos (Leismanina, antígenos para la detección de micosis sistémicas, antisueros para la detección de agentes bacterianos productores de diarreas y pruebas de inmunodiagnóstico para la detección de la infección por *H. pylori* y sus factores de virulencia), surge como una necesidad de dar respuesta a la limitación que genera la dificultad del diagnóstico y por consiguiente el tratamiento oportuno de las diferentes enfermedades. A pesar que los productos se han desarrollado previamente como parte de las líneas de investigación de nuestros laboratorios, y que se han elaborado con éxito a pequeña escala siendo probados en varios laboratorios nacionales, en trabajos de investigación publicados o presentados en congresos nacionales e internacionales y en tesis de grado, se hace necesario realizar los pasos requeridos y llevarlos a un formato

adecuado que permita escalar su producción, distribución y mantenimiento en el tiempo, para así atender a las necesidades de diagnóstico nacional. Actualmente, estos productos dan respuesta a una cantidad importante de pacientes que acuden al Instituto a través del Servicio de Dermatología, el Hospital Vargas, el Hospital Universitario de Caracas, el Hospital Militar, entre otros centros nacionales del sistema público de salud.

El Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” cuenta con las capacidades y gran parte de la infraestructura necesaria, sin embargo requiere de una inversión importante para adecuar los espacios de la planta de producción existente y el laboratorio de control de calidad y poder cumplir así con las pautas y normas de Buenas Prácticas de Manufactura que permitan escalar la producción a un nivel superior para dar respuesta a la alta demanda de estos productos a nivel nacional.

La fortaleza de este proyecto de consolidar una planta de producción de los descritos productos biológicos para diagnóstico, reside en el conocimiento científico y la experiencia de su equipo de trabajo, en la infraestructura del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” y en los saberes adquiridos para lograr el cumplimiento de la permisología nacional, las normas ISO, las Buenas Prácticas de Manufactura y el registro de marca. Siendo esta una innovadora visión dentro del Instituto, el cual desde sus inicios ha representado ser una institución de servicio, docencia e investigación.

## CONCLUSIONES

Los productos de diagnóstico desarrollados en el Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”, son preparados con cepas autóctonas por lo que son altamente específicos para pacientes en Venezuela, tienen alta sensibilidad, representan la única oferta nacional, se producen a costos razonables y responden a una gran necesidad de diagnóstico en el país. Los diferentes grupos de investigación que conforman esta visión de la elaboración de productos para el diagnóstico de enfermedades endémicas en Venezuela, tienen un gran sentido de pertenencia con

la institución y han logrado mantenerse en el tiempo a pesar de las adversidades, siguiendo el legado de cada uno de sus investigadores fundadores; innovando, dándole continuidad a las líneas de investigación, y adaptándolas a las necesidades actuales, uniendo esfuerzos con el objeto de proponer y desarrollar respuestas oportunas al país, basadas en el desarrollo científico.

## REFERENCIAS

- ALBORNOZ M., (1996) “Epidemiología de las Micosis”. En: *Temas de Micología Médica*. Editora: Dra. María C. B. de Albornoz. Litografía Tipografía ELALCA s.r.l. Venezuela; p.1-18.
- ALVARADO P., OSTOS A., FRANQUIZ N., ROSCHMAN-GONZÁLEZ A., ZAMBRANO E., MENDOZA M., (2015). “Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii sensu stricto*”. *Invest. Clín.* 56(2):11-122.
- ALVARADO P., PEREZ Y., ZAMBRANO E., GONZATTI M., ROSCHMAN-GONZÁLEZ A. (2020). “Improved serodiagnosis of histoplasmosis by use of deglycosylated extracellular released antigens of *Histoplasma capsulatum*” *J Microbiol Methods*. doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105981.
- BOHÓRQUEZ AE., CHIURILLO J., VALDERRAMA JM., MARTINEZ E., GRANDA J., BOHÓRQUEZ N., et al., (2010). “Hallazgos clínicos, endoscópicos e histológicos asociados a la infección por *Helicobacter pylori* considerando los genotipos *cagA* y *vacA* en pacientes con dispepsia. Servicio de Gastroenterología. Hospital central Universitario “Antonio María Pineda”. Barquisimeto Estado Lara”. *GEN* 64(2):76-81.
- CAVAZZA M., URRESTARAZU M., CORRENTI M., VIVAS J., ÁVILA M., ORTIZ D., PIÑERO R., et al., (2004). “*Helicobacter pylori* en Venezuela. Un problema infeccioso multifactorial”. *Bol. Ven. Infect.* 15:1.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES., (2003). “Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World”. Recuperado el 25 de mayo 2020 de: [stacks.cdc.gov](https://stacks.cdc.gov)
- CERMEÑO JR., HERNÁNDEZ I., CERMEÑO JJ., GODOY G., ORELLÁN Y., CERMEÑO JJ., (2004). “Epidemiological survey of histoplasmine and paracoccidioidine skin

- reactivity in an agricultural area in Bolívar state, Venezuela". *Eur. J. Epidemiol.* 19: 189–193.
- CONVIT J., (1974). "Leprosy and Leishmaniasis Similar Clinical-Immunological-Pathological Models". *Ethiop. Med. J.* 12,187-195.
- CONVIT J., (2004). "Therapy of Venezuelan Patients with severe Mucocutaneous or early lesions of Diffuse Cutaneous Leishmaniasis with a Vaccine containing Pasteurized *Leishmania* Promastigotes and *Bacillus Calmette-Guerin*". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99(1):57-62
- CONVIT J., (2005). "A typical cutaneous Leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements". *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 99,13-17.
- CONVIT J., CASTELLANOS PL., RONDÓN A., PINARDI ME., ULRICH M., CASTÉS M., BLOOM B., GARCÍA L., (1987). "Immunotherapy versus Chemotherapy in localised Cutaneous Leishmaniasis". *The Lancet* 1(8530):401-5.
- CONVIT J., ULRICH M., FERNÁNDEZ CT., TAPIA FJ., CÁCERES-DITTMAR G., CASTÉS M., et al., (1993). "The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis". *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 87, 444-448.
- CORREA P., PIAZUELO M., (2012). "The gastric precancerous cascade". *J. Dig. Dis.* 13:2-9.
- DA SILVA JF., DE OLIVEIRA HC., MARCOS CM., ASSATO PA., FUSCO AM., SOARES-MENDES., (2016). "Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update". *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 84 (1): 87-94.
- FALCI D., MONTEIRO AA., FERREIRA C., CAURIO B., MAGALHÃES T., XAVIER M., et al., (2019). "Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection". *Open. Forum. Infec. Dis.* 6(4).
- FURUYAM., MIMORI T., GÓMEZ EAL., DE CORONEL VV., KAWA-BATA M., HASHIGUCHI Y., (1989). "Epidemiological survey of leishmaniasis using skin test and ELISA in Ecuador". *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 17: 331-8.
- GOMES, TA., ELIAS, WP., SCALETSKY, IC., GUTH, BE., RODRIGUES, JF., PIAZZA, RM., et al. (2016). "Diarrheogenic *Escherichia coli*". *Braz J M*; 47: 3–30.
- GONZÁLEZ, R., GUTIÉRREZ, J., MARTÍNEZ, JR., RIVERO, L. (2018). "Características etiológicas, clínicas y epidemiológicas de la diarrea aguda infantil en Caracas-Venezuela". *RSVM*; 38:4-9.
- IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, (1994). "Anonymous Live flukes and *Helicobacter pylori*". *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* 61: 1–241.
- LANATA CF., FISCHER-WALKER, CL., OLASCOAGA, AC., TORRES, CX., ARYEE, MJ., BLACK, RE, et al. (2013). "Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review". *PLoS ONE*; 8(9): doi.org/10.1371/journal.pone.0072788
- MALFERTHEINER P., MEGRAUD F., O' MORAIN CA., ATHERTON J., AXON AT., BAZZOLI F., et al., (2017) "Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV/Florence Consensus Report". *Gut*; 66:6-30.
- MARTINEZ D., HERNANDEZ R., ALVARADO p., MENDOZA M., (2013). "Las micosis en Venezuela: casuística de los Grupos de Trabajo en Micología (1984-2010)". *Rev. Iberoam. Micol.* 30(1):39–46.
- MENDOZA M., DÍAZ AM., HUNG MB., ZAMBRANO EA., DÍAZ E., DE ALBORNOZ MC., (2002). "Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media". *Med. Mycol.* 40(5): 447-454.
- MICHELLI, E., MILLÁN, A., RODULFO, H., MICHELLI, M., LUIGGI, J., CARREÑO, N., DE DONATO, M. (2016). "Escherichia coli enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezuela." *Biomédica*; 36:118-27.
- MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD, (2017). *Boletín epidemiológico* 52.
- MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD, SERVICIO AUTÓNOMO INSTITUTO DE BIOMEDICINA "DR. JACINTO CONVIT", (2019). "Programa de Control de Leishmaniasis: Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control". OPS/OMS; 1era. Edición; Caracas, Venezuela
- NOYA O., ALARCÓN B., (1998). "The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens". *Immunol Lett.* 63(1):53-56.
- ORTIZ D., DAOUD G., DAOUD N., CAVAZZA ME., URRESTARAZU MI., et al., (2002). "Evaluación de los niveles de IgA secretora en niños con gastritis crónica infectados con *Helicobacter pylori*". *Arch. Ven. Puer. Pediat.* 65(2):44-49.
- ORTIZ-PRINCZ D., DAOUD G., SALGADO-SABEL A., CAVAZZA ME. (2016). "Helicobacter pylori infection in children: Should it be carefully assessed?". *Europ. Rev. Med. Pharm. Sci.* 20(9):1798-813.
- ORTIZ-PRINCZ D., VILLALTA B., URRESTARAZU MI., SERRANO N., CAVAZZA ME., (2013). "Detección de genes

- de *Helicobacter pylori* en niños venezolanos con dolor abdominal recurrente: una infección para vigilar de cerca". *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 33(1): 322-327.
- PAN, A., (1984). "Leishmania mexicana: Serial Cultivacion of Intracellular Stages in a Cell-Free Medium". *Exp. Parasitol.* 58(1):72-80
- PÉREZ C., OLAIZOLA C., HARTUNG C., MAGALDI S., MARCANO C., MATAS., (2000). "Reservárea y epidemiología de algunas micosis profundas endémicas en Venezuela". *Antib. Infec.* 8: 105-9.
- THE GLOBAL BURDEN OF DISEASES (GBD), (2017). "Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet Infect Dis*; 17(9):909-948.
- VERA R., (2008) "Notas biográficas" *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 28:4-5.
- VERA R., PANIZO M., DOLANDE M., SELGRAD S., (2007). "Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas durante cinco años 2002-2006". *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 27 (2): 112-119.
- WHEAT LJ., AZAR MM., BAHR NC., SPEC A., RELICH RF., HAGE CH., (2016). "Histoplasmosis". *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 30(1):207-27.
- ZAMANI M., EBRAHIMTABAR V., ZAMANI W., MILLER R., ALIZADEH-NAVAEI J., SHOKRI-SHIRVANI M., et al., (2018). "Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection". *Aliment Pharmacol Ther*; 47:868–876.
- ZAMBRANO EA., RODRÍGUEZ I., MENDOZA M., SANTAELLA C., LÓPEZ M., ALBORNOZ M., (2001). "Regulation of serine-type exoproteinases by endogenous inhibitors present in exoantigens of the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*". *Med. Mycol.* 39(4):359-68.
- la Universidad de Arizona en Estados Unidos de América.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la labor invaluable de nuestras alianzas estratégicas con otras instituciones nacionales e internacionales que nos han apoyado en el desarrollo de nuestros productos de diagnóstico en diferentes niveles: el Instituto Nacional de Higiene Dr. Rafael Rangel, Laboratorios de Química de Proteínas, Síntesis de Péptidos y Sección de Biohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, el Instituto FioCruz en Brasil y

# Semblanza de la Dra. Nacarid Aranzazu Hernández

**Maira Cabrera G.<sup>1</sup>**  
mairacab@gmail.com

**Noris Rodríguez<sup>1</sup>**  
nmrodriguez@gmail.com

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

## RESEÑA

Las editoras invitadas de esta edición especial de tribuna del Investigador, dedicada al Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, queremos guardar tributo a la memoria de la Dra. Nacarid Aranzazu, extraordinaria profesional, de gran sensibilidad social y calidad humana.

Nació en la parroquia Sucre de Caracas el 30 de octubre de 1939, en el seno de una familia numerosa. Creció y se educó en distintas instituciones educativas situadas en el Oeste y Centro de Caracas. En 1957 ingresó a la Escuela Luis Razetti de la Universidad Central de Venezuela, para cursar sus estudios de Medicina, graduándose de Médico Cirujano en 1963.



Dra. Nacarid Aranzazu



**Dra. Nacarid Aranzazu**

Siempre estuvo vinculada a la atención de los pacientes con la enfermedad de Hansen. Los tres últimos años de su carrera estuvo trabajando como estudiante de medicina en el ambulatorio de los pacientes con la enfermedad de Hansen, en la antigua División de Lepra situada en Caracas de Mercedes a Luneta. En 1970 fue médico residente del Leprocomio de Cabo Blanco, situado en el entonces Departamento Vargas del Distrito Federal. Allí, trabajando con el Dr. Jacinto Convit, se sensibilizó profundamente con la situación precaria de los pacientes de Lepra, forzosamente aislados y aprendió a tratarlos con respeto y afecto. Luego de esta enriquecedora labor, ingresó al Postgrado de Dermatología de la Escuela de Medicina Dr. José María Vargas de la UCV. Al concluir estos estudios, ingresó al Instituto de Biomedicina, dependiendo del Ministerio de Sanidad y de la facultad de Medicina de la UCV (cátedra de Dermatología de la Escuela Dr. José María Vargas). En Biomedicina, se integró a un distinguido equipo de

médicos dirigidos por el Dr. Convit. Trabajaron tenazmente por el establecimiento de las “Sulfonas” en la terapia de los pacientes con lepra, luego en el programa de la poliquimioterapia y en la inmunoterapia.

En el transcurrir de los años, la Dra. Aranzazu, ocupó varios cargos académicos y asistenciales en el área de la Dermatología. Entre los que destacan: la Dirección del Instituto Médico, Jefatura del Servicio Central de Dermatología Sanitaria y del Departamento de Dermatología Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Profesora Asistente y Jefe de la Cátedra de Dermatología en la Escuela de Medicina “Dr. José María Vargas”, Docente en las Pasantías Clínicas del Programa de Postgrado en distintas universidades nacionales e internacionales, y en la Cátedra de Dermatología en la Universidad de Carabobo. Profesora en la formación de Inspectores de Salud Pública Área de Dermatología Sanitaria, Escuela de Salud Pública, de la UCV.



**Dra. Nacarid Aranzazu junto al Dr. Jacinto Convit**

Todas estas ocupaciones dieron lugar a una productiva labor como puede evidenciarse en sus numerosas publicaciones en prestigiosas revistas académicas nacionales e internacionales, premios a trabajos científicos presentados en congresos realizados en Venezuela y el exterior así como importantes distinciones, entre las que podemos mencionar la Medalla de la Salud en su Primera clase "Dr. Arnoldo Gabaldón" (1997) y la Condecoración José María Vargas, la cual le fue otorgada en 1998.

La Dra Nacarid Aranzazu, falleció el 06 de Agosto 2020. Nos reconforta saber que vio realizado su tan anhelado propósito compartido con el Dr Convit, el de erradicar las leproserías en Venezuela y disminuir el número de pacientes con enfermedad de Hansen logrando que tuvieran mejor calidad de vida.

Expresamos nuestras más sentidas condolencias por tan irreparable pérdida a sus hijos, hermanos y demás familiares y amigos.

Paz a su alma.



Dra. Nacarid Aranzazu

Fotografías: cortesía Vladimir Acosta Aranzazu

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

### TÍTULO DEL TRABAJO EN LETRA FUENTE TIMES NEW ROMAN, TAMAÑO 12, ALINEADO AL CENTRO. MAYÚSCULA, NEGRITA

Un espacio de línea en blanco (todas las líneas en blanco en Times New Roman, Tamaño 10)

Nombre y Apellido de los autores (en todos los casos, omitir títulos profesionales o académicos) centrados y escritos en Times New Roman, Tamaño 10, efecto Versales. Seguido de la Institución donde trabaja y el email.

Ejemplo:

CONSUELO RAMOS<sup>1</sup> y GABRIELA CONTRERAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela. Facultad de Humanidades. ucv.consuelo@gmail.com

<sup>2</sup>Universidad Central de Venezuela. Escuela de Ingeniería Mecánica.gc@hotmail.com

*1 línea en blanco*

### RESUMEN

*1 línea en blanco*

El resumen en Español del artículo es obligatorio y será precedido por el subtítulo RESUMEN, centrado, escrito en fuente Times New Roman, tamaño 10, Mayúsculas, Negrita. El texto del resumen utilizará la fuente Times New Roman, tamaño 10, alineación de párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o izquierda y espacio (entre líneas) sencillo. El resumen no excederá de 15 (quince) líneas. Deberá estar escrito en un solo párrafo de tipo informativo. Debe ser adecuado para su reproducción (sin necesidad de una nueva redacción) por revistas especializadas (Clinical Abstracts, Medicine Abstracts, etc.) y deberá especificar brevemente el proceso experimental y las conclusiones.

*1 línea en blanco*

Palabras Clave: deben incluirse al menos 5 (cinco) Palabras Clave, separadas por punto y coma. Utilice estilo Normal, fuente Times New Roman, tamaño 10, alineación de párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o a la izquierda y con espacio entre líneas sencillo.

*2 líneas en blanco*

### TÍTULO TRADUCIDO AL INGLÉS EN LETRA FUENTE TIMES NEW ROMAN, TAMAÑO 12, ALINEADO AL CENTRO. MAYÚSCULA, NEGRITA

*1 línea en blanco*

### ABSTRACT

El “Abstract” en inglés, al igual que el resumen en español, es obligatorio. Será precedido por el subtítulo ABSTRACT, centrado, escrito en fuente Times New Roman, tamaño 10, Mayúsculas, Negrita. El texto del resumen utilizará la Fuente Times New Roman, Tamaño 10, alineación de párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o izquierda y espacio (entre líneas) sencillo. El “abstract” no excederá de 15 (quince) líneas. Deberá estar escrito en un solo párrafo de tipo informativo. Debe ser adecuado para su reproducción (sin necesidad de una nueva redacción) por revistas especializadas (Clinical Abstracts, Medicine Abstracts, etc.) y deberá especificar brevemente el proceso, los resultados y las conclusiones principales.

*1 línea en blanco*

Keywords: Deben incluirse las Palabras Clave traducidas al inglés, separadas por comas. Utilice estilo Normal, fuente Times New Roman, tamaño 10, alineamiento con párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o a la izquierda y con espacio entre líneas sencillo.

*2 líneas en blanco*

## INTRODUCCIÓN

### *1 línea en blanco*

La introducción y el resto del texto del trabajo deben escribirse a espacio sencillo, a dos columnas, en un solo lado del papel y en hojas tamaño carta (21,5 x 28 cm), con márgenes de 2,5 cm por lado y espaciado entre columnas de 0,5 cm, utilizando estilo Normal, fuente Times New Roman, tamaño 11, alineamiento con párrafo justificado, sin sangría, sólo en caso de que el trabajo sea aceptado para su publicación.

Se aconseja a los autores utilizar subtítulos descriptivos de la forma siguiente de acuerdo al trabajo: Introducción, Materiales y Métodos o Metodología, Técnicas Experimentales, Resultados, Análisis, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos y Referencias. Los **SUB-TÍTULOS** de cada sección en estilo Título 2, fuente Times New Roman, tamaño 11, mayúsculas, negrita, sin numeración, separados del párrafo anterior con una línea en blanco, y del párrafo siguiente con una línea en blanco.

El manuscrito debe ser claro y conciso y preferiblemente con una extensión total no mayor de 15 páginas incluyendo figuras y tablas. Se preparará en formato .doc en procesador de textos **MS Word versión 6.0 en adelante**. Se enviarán al Comité Editor de la Revista vía internet al siguiente correo: [ucvapiu@gmail.com](mailto:ucvapiu@gmail.com). Para el contenido del trabajo serán utilizados los siguientes formatos y alineaciones:

**Abreviaturas, símbolos y terminología.** En caso de incluir en el texto abreviaturas nuevas o especiales, debe incluirse en el manuscrito un listado de las mismas con su significado. La terminología química debe incluirse de acuerdo con las normas del Comité de Nomenclatura de la IUPAC (Internacional Unión of Pure and Applied Chemistry). Las unidades deben seguir las Normas del Sistema Internacional de Unidades.

**Leyendas, Gráficos y Tablas:** Deben ser incluidas en el texto final tamaño y tipo de letra (Times New Roman 10), en colores blanco y negro. Cada figura, gráfico y tabla se anexarán al final del manuscrito en hojas separadas, sólo en el caso de arbitraje.

**Tablas** – Construidas con la herramienta Tabla del pro-

cesador MS Word, deberán ser numeradas consecutivamente, referidas en el texto e insertadas en el lugar correspondiente. Para su incorporación en el texto, dejar una línea en blanco antes de la tabla y dos líneas en blanco después de ella. Cada tabla debe tener un título breve. Las aclaratorias deben estar al pie, no en el título. Los encabezamientos de las columnas serán cortos, abreviados y cuando sea necesario, serán explicadas en notas al pie.

**Títulos de tablas** – Deberán ser incluidos en una línea inmediata superior de la Tabla y alinearlos a la izquierda, coincidiendo con el margen izquierdo de la tabla. Utilice fuente Times New Roman, tamaño 10. Ejemplo:

**Tabla 1.** Parámetros técnicas analíticas utilizadas.

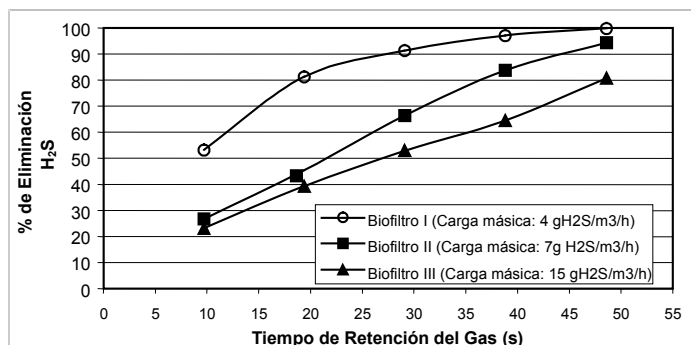
Parámetro	Técnica Analítica	Unidad
pH	Directo, Potenciométrico	-----
SST	SM, Gravimétrico	mg/L
SSV	SM, Gravimétrico	mg/L
DQO	SM, Reflujo Abierto	mg/L

SM: Standard Methods

**Figuras / Fotografías** – Todas las figuras, gráficos, ilustraciones y fotografías serán consideradas como figuras en formato JPG 300Dpi y deberán ser numeradas consecutivamente con números arábigos, referidas en el texto e insertadas en el lugar correspondiente. Su presentación se hará a color o en blanco y negro. Las fotomicrografías deben incluir una escala gráfica. En caso de requerir leyendas, éstas deberán escribirse utilizando fuente Times New Roman, tamaño 10. Para su incorporación en el texto, dejar una línea en blanco antes de la figura y dos líneas en blanco después de ella.

**Título de Figura / Fotografía** – Deberá ser incluido en la línea inmediatamente inferior de la Figura, alineado a la izquierda, coincidiendo con el margen izquierdo de la Figura y utilizando fuente Times New Roman, Tamaño 10.

Ejemplo:



**Figura 1.** Eliminación de H<sub>2</sub>S en función del tiempo de retención para diferentes cargas máxicas en los biofiltros.

**Fórmulas o Ecuaciones** – Deberán ser generadas por editores de ecuaciones actualizados, utilizando fuente Times New Roman, tamaño 10, negritas y centradas. También deberán ser numeradas en secuencia y referidas en el texto. Para su incorporación dejar una línea en blanco, antes y después de la ecuación. Ejemplo:

$$\frac{\partial(\epsilon v)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x}(\rho u) + \frac{\partial}{\partial y}(\rho v) = 0 \quad (1)$$

**Referencias:** Las referencias deben limitarse a trabajos publicados pertinentes al artículo y citadas en el texto. Un “Abstract” identificado adecuadamente / Abs..) puede ser citado sólo cuando sea la única fuente bibliográfica disponible. Los autores son responsables de la exactitud de las referencias. Las referencias deben ser ordenadas alfabéticamente. La cita de cada referencia debe ser incluida en el texto por el apellido del autor y año de publicación. Cuando la cita de cada referencia tenga más de un autor se colocará según el ejemplo: (Acosta et al. 2004). El estilo de citación debe ser el siguiente:

**Artículos:** Apellido del primer autor, seguido por las iniciales de su nombre, iniciales del nombre y apellido de cada coautor, año, título del trabajo (solamente con

la primera letra en mayúscula), nombre de la revista (abreviado como en Word List of Scientific Periodicals y en letras cursivas o subrayado, volumen número (N°) (si es necesario) y página inicial – página final. Se debe utilizar fuente Times New Roman 10, efecto versal para el nombre del o los autores. Alineación de párrafo justificado y sangría de 0,7 cm a la izquierda a partir de la segunda línea del párrafo. Ejemplos:

PIERMATTEI D., (1996). “Atlas de abordajes quirúrgicos de huesos y articulaciones. Perros y gatos”. 3a. Edición. Interamericana Mc Graw-Hill, México. p. 298-299.

KYLE R.F., SCHAFFHAUSEN J.M., BECHTOLD J.E., (1991). “Biomechanical characteristics of interlocking femoral nails in the treatment of complex femoral fractures”. Clinical Orthopaedics 267(15): 169-173 y/o 267:169-173.

KAPANDJI A., (1998). “Fisiología Articular, Miembro Superior”. Editorial Medica Panamericana; 5ta Edición; Tomo I, Madrid, España.

Zimmer Internal fracture fixation, Catálogo, sección B. U.S.A, (1998). www.zimmer.com. Consultado el 10/10/2010.

**NOTA:** Las contribuciones no deben exceder a las siguientes extensiones:

**Ensayos, artículos de opinión y reseñas** (5 páginas, Times New, letra 12, a doble espacio, máximo una figura y una tabla.

Para **Artículos de revisión y artículos científicos** (15 páginas).

**Comunicaciones cortas** (hasta 7 páginas) bajo las mismas especificaciones.

## Revista Tribuna del Investigador

### INSTRUCCIONES A LOS ÁRBITROS

La revisión de los pares es el elemento central del proceso de arbitraje. Para que el proceso sea imparcial se aplica el sistema doble ciego (autores y árbitros son anónimos). Todo trabajo debe ajustarse a las normas exigidas por la Revista Tribuna del Investigador. Los árbitros deberán considerar la pertinencia del artículo para el área. Exigir que el trabajo tenga claridad, coherencia, buena ortografía, originalidad y vigencia o importancia de la investigación desarrollada. Los árbitros deberán regirse por la guía anexa (Planilla de Evaluación) explicando en el formulario aquellos aspectos que considere necesarios para orientar y hacer sugerencias que considere necesarias a los autores y podrá utilizar hojas adicionales si lo estiman conveniente para brindar una información amplia a los autores. El arbitraje debe ser un proceso didáctico que permita calidad de los artículos publicados.

Aspectos a considerar	Criterios de evaluación
Título	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. El título debe resumir la idea principal del trabajo.</li> <li>2. Debe expresar el objeto e intención de investigación.</li> <li>3. La extensión no debe exceder de doce palabras.</li> <li>4. Una buena opción para determinar un buen título, es que sea la expresión del resultado más importante de la investigación</li> </ol>
Resumen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No debe exceder de 250 palabras y ser un sumario completo del contenido del trabajo.</li> <li>2. Toda información debe proceder del texto del trabajo, que permita a los lectores reconocer con rapidez el contenido.</li> <li>3. Debe ser preciso, que refleje de manera correcta el objetivo y contenido del manuscrito.</li> <li>4. Deben definirse todas las abreviaturas (excepto las unidades de medida) y los acrónimos.</li> <li>5. Sólo debe incluirse información que aparezca en el cuerpo del escrito. Debe contener: breve introducción que justifique la temática, objetivos generales de la investigación, metodología (métodos y técnicas utilizados) en el proceso de investigación, resultados y una síntesis de las conclusiones del trabajo.</li> </ol>
Palabras clave	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Deben ser representativas del trabajo para facilitar su consulta en bases de datos. Debe evitarse el uso de palabras genéricas.</li> </ol>
Introducción	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Debe representar el trabajo a través de una justificación sustentada.</li> <li>2. Debe dar cuenta de la importancia del trabajo</li> </ol>
Desarrollo del Trabajo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Consideraciones teóricas y metodológicas que sustentan el trabajo.</li> <li>2. Uso correcto del idioma (sintaxis, gramática)</li> <li>3. Cuando se utilicen abreviaturas, la primera vez que aparezcan en el texto, deben ser precedidas por el significado en extenso.</li> <li>4. Organización interna coherente y equilibrada.</li> <li>5. Toda información empírica debe tener la fuente y referente teórico.</li> <li>6. Se recomienda que los trabajos teóricos confronten autores.</li> <li>7. Debe quedar claro cuál es el aporte del o los autores del artículo</li> </ol>

Notas a pie de página	1. Son sólo para aclarar o ampliar aspectos. No se debe incluir referencias bibliográficas.
Conclusiones	1. Deben constituir una reflexión de los resultados y derivarse del cuerpo del trabajo.
Bibliografía	1. Dependiendo de la temática, debe reflejar uso de publicaciones recientes.

### OPINIÓN GENERAL:

Calificativo	Criterios de evaluación
Publicable sin modificaciones	El trabajo no tiene observación, ni de forma ni de fondo
Publicable con ligeras modificaciones	El trabajo amerita modificaciones de forma
Publicable con modificaciones sustanciales	El trabajo amerita importantes modificaciones de fondo
NEGADO	El trabajo tiene problemas de forma y fondo cuya corrección implica reelaboración del trabajo.

# Tribuna del Investigador

VOLUMEN 21, NÚMERO 2, 2020

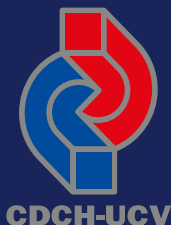
EDITORIAL	
El Instituto de Biomedicina a los 55 años de su creación	4
<b>Noris Rodríguez</b>	
ARTÍCULOS	
Jacinto Convit: vida, obra y accionar para el control de las endemias	7
<b>Ana María Zulueta, Bailde García</b>	
Educación médica de calidad utilizando tecnología de información y comunicación: SOS Telemedicina-UCV. 55 aniversario del Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit"	18
<b>Jesús Francisco Velázquez Rojas</b>	
Dermatología del nuevo milenio: ¿futuro o ya está aquí?	26
<b>Zulay Rivera Pineda</b>	
Tejiendo la red de la ciencia para la salud en pro de un "mundo apropiado para los niños"	35
<b>Alicia Ponte-Sucre</b>	
Diversidad genética de hongos productores de micosis en Venezuela	43
<b>Primavera Alvarado, Julio Vivas</b>	
Lepra en Venezuela: Puesta al día	52
<b>Lucibel Crespo, Elsa Rada, José Guevara</b>	
Factores de riesgo en lepra	66
<b>Teresa Rivera, Noris Rodríguez, Henry Oviedo, José Avilán Rovira, Rafael Borges</b>	
Avances sobre una vacuna para la Enfermedad de Hansen	75
<b>Nazareth Durán Rondón, Elsa Rada, Oscar Reyes-Jaimes, Lucibel Crespo</b>	
Pruebas inmunológicas diagnósticas en la enfermedad de Hansen	90
<b>Elsa Rada, Lucibel Crespo, Ramon Guevara</b>	
<i>Melinis minutiflora</i> (capín melao): una gramínea de importancia alérgica en Venezuela	98
<b>Franca Puccio, Domenico Cifarelli, Elianska López, Isabel Hagel, María Cristina Di Prisco, Francesca Castejón</b>	
Asociación entre factores inmunológicos presentes en la leche materna y el desarrollo de dermatitis atópica en lactantes	105
<b>Ingrid Rivera, María Mercedes Hernández, Zulay Rivera, María Cristina Di Prisco, Dennis Lugo, Maira Cabrera, Isabel Hagel</b>	
Factores determinantes de tuberculosis entre los indígenas Warao del Delta Venezolano: genética e inmunidad	116
<b>Zaida Araujo, Aime Tillett García, Jacobus H. de Waard</b>	
Laboratorio de tuberculosis, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit". 20 años de diagnóstico e investigación	132
<b>Franklin Ennodio Claro Almeida, Douglas Alexander Silva Duarte, Jacobus H. de Waard</b>	
Melasma en mujeres latinas y caucásicas de Venezuela	142
<b>Zulay Rivera, Ingrid Rivera, Victor Ollarves, Dennis A. Lugo, Isabel Hagel</b>	
Lupus eritematoso anticuerpos antinucleares: AAN, anti ADN, anti RNP, anti SM	151
<b>Aniuský Brazón, Jennifer Frías, Nieves González, Ricardo Pérez-Alfonzo</b>	
Estrategias de análisis por citometría de flujo de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis cutánea Americana	158
<b>Orquídea L. Rodríguez, Martín A. Sánchez, Félix J. Tapia</b>	
Estudio molecular de resistencia al antimoniato de meglumina (Glucantime®) en aislados de <i>Leishmania sp.</i> de referencia internacional y de pacientes con Leishmaniasis cutánea localizada	169
<b>Diego Pereira, Noris Rodríguez</b>	
Estudio preliminar del efecto <i>in vitro</i> del extracto de hojas de <i>Artemisia annua</i> en el crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i>	178
<b>Zoraya de Guglielmo, Henry Oviedo, Miguel Rojas, Noris Rodríguez</b>	
Inmunogenicidad de péptidos sintéticos de p36/LACK de <i>Leishmania donovani</i> en caninos con leishmaniasis visceral	186
<b>Dennis A. Lugo, Guillermo Terán-Angel, Maira Cabrera</b>	
Leishmaniasis visceral: aproximación a un programa de control integral en áreas endémicas del estado Nueva Esparta	195
<b>Martín A. Sánchez, Bailde García Guevara, Antonio Salgado</b>	
Viviendo dentro del enemigo: supervivencia de <i>Leishmania</i> en el interior de células fagocíticas	203
<b>Zelandia Fermín, Ana Andreína Alviares, Luis José Díaz</b>	
Modelo para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea: interdisciplinariedad biomédico, clínico y socio-antropológico	215
<b>José Carrero, Noris Rodríguez, Eliana Carrero, Alberts Carrero, Lexis Carrero</b>	
Reseña de las investigaciones sobre la infección del virus papiloma humano en el Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit"	224
<b>María Eugenia Cavazza, Diana Ortiz Princz, Maira Avila, María Correnti</b>	
Innovación biológica en productos para el diagnóstico: un aporte al desarrollo sostenible de la salud en Venezuela	234
<b>Diana Ortiz Princz, Rosabel González, María Argelia Polegre, Primavera Alvarado, María Eugenia Cavazza</b>	
Semblanza de la Dra. Nacarid Aranzazu Hernández	245
<b>Maira Cabrera G., Noris Rodríguez</b>	

## PROGRESO DE

ASOCIACIÓN PARA EL  
UNIVERSITARIA



LA INVESTIGACIÓN



Ingresa a [saber.ucv.ve](http://saber.ucv.ve)  
Aumenta la visibilidad de sus  
publicaciones