

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD “SELADIS”**



**EVALUACION DE LA REACTIVACION IN VITRO DE
LINFOCITOS PROVENIENTES DE RATONES
INMUNIZADOS CON EL ANTIGENO DE LEISHMANIA Y
TRATADOS CON EL EXTRACTO TOTAL DE
ALCALOIDES DE EVANTA**

(Tesis para la obtención del Grado de Especialidad en Diagnostico de Laboratorio en Salud)

POR: Lic. NORMA KARINA RUIZ ROSALES

**ASESORES: Dra. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS
Dr. WALTER MAGARIÑOS LOREDO**

LA PAZ – BOLIVIA

2012

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”
Filipenses 4. 10 – 20

DEDICATORIA

*A mis amados papitos y hermanos por
todo su amor, paciencia, comprensión y el
apoyo brindado todos los días de mi vida.*

A mi ángel de la guarda: Mateito.

A ti AMOR.

AGRADECIMIENTOS

- *Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a Dios por haberme dado la vida, la hermosa familia que me regalo y la oportunidad de hacer realidad este gran sueño.*
- *A mis amados papitos Bernardino y Jahel, por todo su amor, su comprensión, por estar siempre y en todo momento conmigo y por sobre todo por ser los mejores del mundo, los mejores.*
- *A mis hermanos en especial a mi segunda mamá Tere, a Silvia y Jenny por todo su apoyo, sus consejos tan valiosos que me ayudaron a llegar a esta etapa de mi vida.*
- *A mis hermosos y queridos sobrinos por su amor, su comprensión y porque son parte de mi vida.... Los quiero mucho*
- *A mis asesores: Dr. Walter Magariños y en especial a la Dra. Jacqueline Calla de quienes aprendí mucho y siempre estaré muy agradecida por todo su apoyo, su guía y sus enseñanzas que me ayudaron a concluir el presente trabajo y a llegar a esta etapa de mi vida.*
- *Al Dr. Roger Carvajal por su apoyo incondicional, su amistad, su guía, sus enseñanzas que me ayudaron también para la conclusión del presente trabajo.*
- *Al Dr. Fernando Sosa y Dr. Bernardo Torrico por sus valiosos consejos y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.*
- *Al instituto SELADIS por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de hacer realidad este hermoso sueño.*
- *A todos los docentes del instituto SELADIS por ser parte de mi formación, en especial a la Dra. María Luz Soto por su apoyo, su amistad y confianza que me motivaron para seguir adelante a pesar de las adversidades.*
- *Al Dr. Walter Montaña, Dr. Marcos Escobar y Yonny Paredes por su amistad y especialmente por su apoyo y confianza a lo largo de la especialidad y la realización del presente trabajo con quienes estaré eternamente agradecida.*
- *A mi Grupo "Brimas" y sus componentes: Erick, Julito, Britt, Patty, Gaba, Andrea, Chirqui y en especial a mi Nena Danny porque me enseñaron a amar mi carrera,*

a dedicar mi trabajo al servicio de la comunidad y principalmente por enseñarme el verdadero sentido de la amistad.

- *A mis amigos del Instituto SELADIS: Carlita, Clau, Checho, Ronald, Mony, Rami, Hector, Teo, Kary, Paula y todos por estar siempre a mi lado brindándome su amistad.*
- *A ti AMOR por todo tu apoyo en los momentos más difíciles.*

A todos ellos:

MUCHAS GRACIAS!!!!!!!!!!

TABLA DE CONTENIDO

I.INTRODUCCION	1
II.MARCO TEORICO	4
1. EPIDEMIOLOGIA	4
2. LEISHMANIASIS	6
2.1. ETIOLOGÍA	6
2.1.1. LEISHMANIA	7
a) MORFOLOGÍA	8
2.1.2. CICLO BIOLÓGICO	10
2.2. RESERVORIO	12
2.3. VECTOR	12
2.4. ASPECTOS CLÍNICOS	13
2.5. FORMAS CLÍNICAS	15
2.5.1. LEISHMANIASIS CUTÁNEA (LC)	15
a). LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA (LCL)	15
b). LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA (LCD)	16
2.5.2. LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA (LMC)	17
2.5.3. LEISHMANIASIS VISCERAL (LV)	18
2.6. TRATAMIENTO	19

2.6.1. EVANTA	21
3.- INMUNIDAD	22
3.1. RESPUESTA INMUNE EN ENFERMEDADES PARASITARIAS	23
3.2. RESPUESTA INMUNE EN LEISHMANIASIS	25
3.2.2. CITOQUINAS	30
3.2.2.1. PROPIEDADES GENERALES DE LAS CITOQUINAS	31
3.2.2.2. PRINCIPALES TIPOS DE RESPUESTA MEDIADOS POR LA ACCIÓN DE LAS CITOQUINAS	33
3.2.2.3. MECANISMO DE REGULACIÓN DE CITOQUINAS	34
INTERLEUCINA – 1 (IL-1)	35
INTERLEUCINA – 2 (IL-2)	35
INTERLEUCINA – 4 (IL-4)	36
INTERLEUCINA – 5 (IL-5)	36
INTERLEUCINA – 6 (IL-6)	36
INTERLEUCINA – 8 (IL-8)	36
INTERLEUCINA – 9 (IL-9)	36
INTERLEUCINA – 10 (IL-10)	37
INTERLEUCINA – 12 (IL-12)	37
3.2.3. INTERFERÓN	38

3.2.3.1. INTERFERÓN GAMMA (INF-)	39
3.2.4. FACTOR TRANSFORMANTE DE CRECIMIENTO (TGF-)	40
3.3. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CITOQUINAS	40
3.3.1. ANÁLISIS POR ENZIMAS FIJADAS A INMUNOADSORVENTES (ELISA)	40
3.3.1.1. FASES DE UN ENSAYO ELISA	42
3.3.1.2. PASOS GENERALES DE UN ELISA	43
3.3.1.3. SISTEMA DE AVIDINA – BIOTINA	45
III. ANTECEDENTES	46
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53
V. JUSTIFICACION	54
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACION	55
VII. OBJETIVOS	56
1. OBJETIVO GENERAL	56
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
VIII. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	57
1. POBLACIÓN EN ESTUDIO	57
2. DESCRIPCIÓN	57
3. TAMAÑO DE LA MUESTRA	57

4. CONTEXTO Y LUGAR	57
IX. DISEÑO DE ESTUDIO	58
1. TIPO DE DISEÑO	58
X. MATERIALES Y METODOS	59
1.- MATERIALES	59
1.1. REACTIVOS	59
a) CULTIVO DE LEISHMANIA	59
b) OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO DE LEISHMANIA	59
c) INMUNIZACIÓN Y TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE RATONES BALB/C	59
d) CULTIVO CELULAR	60
e) EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	60
f) DETERMINACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA DE RATÓN	60
1.2. EQUIPOS	60
1.3. OTROS MATERIALES	61
2.- MÉTODOS	61
2.1. CULTIVO DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA <i>BRAZILIENSIS</i>	61
2.2. OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO TOTAL DE LEISHMANIA <i>BRAZILIENSIS</i>	62
2.3. INMUNIZACIÓN Y TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE RATONES BALB/C	63

a) PRIMERA ETAPA - PROCESO DE INMUNIZACIÓN <i>IN VIVO</i>	63
b) SEGUNDA ETAPA - TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i>	64
c) TERCERA ETAPA - REACTIVACIÓN <i>EX VIVO</i> DE LINFOCITOS	64
2.4. CULTIVO CELULAR	65
2.4.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	65
2.4.2. DETECCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (INF-)	67
XI. RESULTADOS	70
1. EFECTO DEL E.A.E. SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO	71
2. EFECTO DEL EAE SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR EL ANTÍGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO	74
3. EFECTO DEL EAE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INF- INDUCIDA POR CON A	76
4. EFECTO DEL EAE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INF- INDUCIDA POR EL ANTÍGENO DE LEISHMANIA	79
XII.- DISCUSION	81
XIII.- CONCLUSIONES	87
XIV.- RECOMENDACIONES	88

XV.- BIBLIOGRAFIA	89
XVI.- ANEXOS	98
ANEXO N° 1	99
ANEXO N° 2	99
ANEXO N° 3	99
ANEXO N° 4	100
ANEXO N° 5	100
ANEXO N° 6	101
ANEXO N° 7	102
ANEXO N° 8	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. ESTRATIFICACIÓN DE CASOS DE LEISHMANIASIS EN BOLIVIA	6
Figura 2. PROMASTIGOTES AXÉNICOS EN CULTIVO	8
<i>Figura 3. LEISHMANIA SP. AMASTIGOTES EN MACRÓFAGO</i>	9
Figura 4. CICLO DE VIDA DE LEISHMANIA SPP	10
Figura 5. LUTZOMYIA LONGIPALPIS. EN AMÉRICA	12
Figura 6. PHLEBOTOMUS SP. VIEJO MUNDO	12
Figuras 7 y 8. LEISHMANIASIS CUTÁNEA	15
Figuras 9 y 10. LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA O DISEMINADA	16
Figuras 11 y 12. LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA	17
Figuras 13 y 14. LEISHMANIASIS VISCERAL. HEPATOESPLENOMEGALIA	18
Figura 15. REACCIÓN INMUNITARIA A LEISHMANIA	27
Figura 16. TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA DEL MTT A LA SAL DE FORMAZÁN	30
Figura 17. ACCIÓN DE LAS CITOQUINAS SOBRE LAS CÉLULAS	31
Figura 18. EFECTOS DE LAS CITOCINAS	32
Figura 19. EFECTOS BIOLÓGICOS DE TH1 Y TH2	34
Figura 21. 1. TAPIZADO DEL POCILLO CON EL AG O AC	

Figura 22. 2. ADICIÓN DE LA MUESTRA PROBLEMA CON LA MEZCLA DE Ag. O Ac.	43
Figura 23. 3. UNIÓN DEL Ag. O Ac. ESPECÍFICO AL Ag. O Ac TAPIZADO EN EL POCILLO	44
Figura 24. 4. LAVADO DEL POCILLO PARA ELIMINAR EL EXCESO DE Ag. O Ac. NO UNIDO	44
Figura 25. 5. ADICIÓN DEL AC SECUNDARIO MARCADO CON LA ENZIMA	44
Figura 26. 6. UNIÓN DEL AC SECUNDARIO AL Ag. O Ac.	44
Figura 27. 7. LAVADO DEL POCILLO PARA ELIMINAR EL EXCESO DE ENZIMA NO UNIDA	44
Figura 28. 8. ADICIÓN DEL SUSTRATO	44
Figura 29. 9. UNIÓN DEL SUSTRATO A LA ENZIMA	45
Figura 30. 10. DESARROLLO DEL COLOR	45
Figura 31. PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS EN CULTIVO	61
Figura 32. MICROSCOPIO INVERTIDO PARA OBSERVAR LA VIABILIDAD DE LEISHMANIA <i>BRAZILIENSIS</i>	62
Figura 33. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE LEISHMANIA POR SONICACIÓN Y CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN	63
Figura 34. INMUNIZACIÓN <i>IN VIVO</i> VÍA INTRAPERITONEAL DE RATONES	

DE LA CEPA BALB/C	63
Figura 35. TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> VÍA ENDOVENOSA DE RATONES	
DE LA CEPA BALB/C	64
Figura 36. CÉLULAS DE BAZO DE RATONES DE LA CEPA BALB/C	65
Figura 37. PROTOCOLO GENERAL DEL ENSAYO	66
Figura 38. CÉLULAS DE BAZO DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN Y DEL	
ENSAYO DE MTT	67
Figura 39. DETERMINACIÓN DE INF- POR EL MÉTODO ELISA	68
Figura 40. LEISHMANIA <i>BRAZILIENSIS</i> . PROMASTIGOTES FORMANDO	
LAS TÍPICAS ROSETAS	70

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	71
Gráfica 2. PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR EL ANTÍGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	74
Gráfica 3. PRODUCCIÓN DE INF- INDUCIDA POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	76
Gráfica 4. PRODUCCIÓN DE INF- INDUCIDA POR EL ANTÍGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	79

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR INDUCIDA POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION DE ESTUDIO	73
Tabla N° 2. PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR INDUCIDA POR EL ANTIGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION DE ESTUDIO	75
Tabla N° 3. PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PRODUCCION DE INF- INDUCIDA POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION DE ESTUDIO	78
Tabla N° 4. PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PRODUCCION DE INF- INDUCIDA POR EL ANTIGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION DE ESTUDIO	79

RESUMEN

EVALUACION DE LA REACTIVACION IN VITRO DE LINFOCITOS PROVENIENTES DE RATONES INMUNIZADOS CON EL ANTIGENO DE LEISHMANIA Y TRATADOS CON EL EXTRACTO TOTAL DE ALCALOIDES DE EVANTA (EAE)

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias de distribución mundial transmitidas al ser humano por la picadura de flebótomos infectados por protozoos del género *Leishmania*. Esta enfermedad se manifiesta en sus formas: cutánea (localizada y difusa), mucocutánea y visceral, los cuales son el resultado de una compleja interacción entre la especie del parásito involucrado y la respuesta inmunológica del paciente.

La leishmaniasis, es la causa de una considerable mortalidad y morbilidad alrededor del mundo, en Bolivia, afecta aproximadamente 1800 casos nuevos al año. La mortalidad es uno de los indicadores que aún no se ha estudiado, pero se tiene referencia de personas con procesos crónicos avanzados de Leishmaniasis mucocutánea, los cuales tienen un compromiso psicológico importante que hace que se aísle de la sociedad (muerte psicológica).

Por la importancia de esta enfermedad, ya que se trata de un problema de salud pública, en nuestro país se han realizado diferentes estudios que pretenden la búsqueda de tratamientos leishmanicidas con base en productos naturales. La Evanta (*Galipea longiflora Krause*) es una planta que ha sido estudiada para este fin y se demostró que tiene un efecto leishmanicida *in vitro*. Posteriormente se realizaron estudios sobre el efecto que tiene esta planta en la respuesta inmune generada en la Leishmaniasis analizando algunos efectores que mostraron un posible efecto Inmunomodulador.

En el presente trabajo se realizó un estudio *in vivo* en ratones hembras de la cepa Balb/c las cuales fueron inmunizadas con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* y tratadas con el extracto total de alcaloides de Evanta. Posteriormente se realizó un estudio *in vitro* de la funcionalidad de las células obtenidas del bazo de estos animales de experimentación sobre las cuales se analizó la proliferación celular y la capacidad de producción de Interferón-gamma (INF- γ).

Los resultados muestran inhibición de la proliferación celular, tanto en células estimuladas con Concanavalina A (Con A) como en aquellas estimuladas con el antígeno de leishmania. Se vió que la inhibición es Dosis – Dependiente, es decir, a mayor dosis del extracto de Evanta utilizado en el tratamiento *in vivo* mayor el efecto inhibitor de la proliferación celular.

Al analizar el efecto del extracto de Evanta sobre la producción de INF- en sobrenadantes de los cultivos celulares se vió también el mismo efecto: una inhibición Dosis – Dependiente (a mayor dosis, mayor inhibición) tanto en células estimuladas con Con A como en las estimuladas con el antígeno total de *Leishmania braziliensis*. Estos resultados permiten apoyar la hipótesis de los estudios previos *in vitro* donde el extracto total de alcaloides de Evanta además de actuar sobre el parásito, gracias a su efecto leishmanicida, actúa modulando la respuesta inmune la cual es crucial en la expresión clínica de la enfermedad.

Deben realizarse otros estudios *in vivo* que apoyen los resultados hallados en esta investigación y así poder confirmar el efecto Inmunomodulador del extracto total de alcaloides de Evanta y descartar un posible efecto inmunotóxico.

Palabras claves: Leishmaniasis, Respuesta inmune en Leishmaniasis, Proliferación celular, Interferón INF- , Extracto Total de Alcaloides de Evanta.

ABSTRACT

EVALUATION OF IN VITRO LYMPHOCYTE REACTIVATION FROM MICE IMMUNIZED WITH LEISHMANIA ANTIGEN AND TREATED WITH TOTAL ALKALOID EXTRACT OF EVANTA (AEE)

Leishmaniasis are a group of parasitic diseases worldwide distribution transmitted to humans by the bite of infected sand flies by *Leishmania* protozoa. This disease is manifested in its forms: cutaneous (localized and diffuse), mucocutaneous and visceral, which are the result of a complex interaction between the parasite involved and the patient's immune response.

Leishmaniasis is a cause of significant mortality and morbidity worldwide, in Bolivia, affect approximately 1800 new cases per year. Mortality is one of the indicators that have not been studied, but there is reference to people with advanced chronic mucocutaneous Leishmaniasis, which have an important psychological commitment that makes the isolation of society (psychological death).

Given the importance of this disease, since it is a public health problem in our country there have been various studies that pretend to find leishmanicida treatments based on natural products. The evanta (*Galipea longiflora* Krause) is a plant that has been studied for this purpose and shown to have a leishmanicidal effect in vitro. Subsequently, studies on the effect of this plant in the immune response generated in Leishmaniasis analyzing some effectors that showed a possible immunomodulatory effect.

In this paper, we performed an in vivo study in female mice of strain BALB / c which were immunized with *Leishmania braziliensis* total antigen; they were treated with total alkaloids extract of evanta. Subsequently performed an in vitro study about functionality of spleen cells obtained from these experimental animals, which was analyzed on cell proliferation and the production capacity of interferon-gamma (INF- γ).

Results show inhibition of cell proliferation both in cells stimulated with Concanavalin A (Con A) as in those stimulated with the antigen of leishmania. It was found that the

inhibition is dose - dependent, the greater dose of the extract of evanta used in the treatment in vivo the inhibitoriest effect of cell proliferation.

By analyzing the extract of evanta effect on the production of INF- in cell culture supernatants was also the same effect: inhibition dose - dependent (the higher the dose, the greater inhibition) both in cells stimulated with Con A as in stimulated with the total *Leishmania braziliensis* antigen. These results support the hypothesis of the previous in vitro studies where the total alkaloids extract evanta addition to acting on the parasite, because of its effect leishmanicidal, it modulates the immune response which is crucial in the clinical expression of the disease.

Other studies should be performed in vivo to support the results found in this research so we can confirm the immunomodulatory effect of total alkaloid extract of evanta and discard possible immunotoxic effect.

Keywords: Leishmaniasis, Immune Response in Leishmaniasis, cell Proliferati3n, Interfer3n INF- , alkaloid extract of Evanta (AEE).

I. INTRODUCCIÓN.-

La Leishmaniasis es una enfermedad zoonótica transmisible que es el resultado del parasitismo de un vertebrado por un protozoo flagelado del género *Leishmania*. La fuente o reservorio de la infección son los animales, como por ejemplo, roedores, perros y diversos mamíferos salvajes¹.

La Leishmaniasis es endémica en 88 países de los 5 continentes donde un total de 350 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección. La prevalencia estimada en todo el mundo es de aproximadamente 12 millones de personas. En Bolivia, la Leishmaniasis afecta aproximadamente un estimado de 1800 casos nuevos anualmente^{2,3}.

La Leishmaniasis tiene diversas manifestaciones clínicas y se presenta en cuatro formas diferentes: Lesiones ulcerosas de la piel o Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), inflamación de mucosa destructiva o Leishmaniasis muco cutánea (LMC) y Leishmaniasis visceral (LV), esta última es la forma más grave de la enfermedad, siendo mortal en casi la totalidad de los casos cuando el enfermo no recibe el tratamiento adecuado. Los síntomas de esta variante incluyen accesos de fiebre, pigmentación de la piel, pérdida de peso y alteración de los componentes sanguíneos. Se asume que tanto la especie de protozoo causal como el estado inmunológico previo del huésped tienen importancia para condicionar el estado clínico del proceso^{1,2}.

El periodo de incubación de la enfermedad oscila desde varias semanas a meses y el riesgo de adquirir la infección es mayor en los países en vías de desarrollo⁴.

Las lesiones recurrentes son frecuentes, estas pueden deberse al fracaso del tratamiento o a la reinfección, tanto las características del huésped en cuanto a la respuesta inmune como la resistencia de *Leishmania* contra drogas leishmanicidas pueden influir en el fracaso del tratamiento³.

El sistema inmune es crucial en el control de la infección por *Leishmania*. La inmunidad mediada por células juega un rol central en la respuesta a patógenos intracelulares².

El tratamiento que generalmente se utiliza para combatir la leishmaniasis es el empleo de componentes antimoniales pentavalentes como Glucantime. Para pacientes con fracaso terapéutico o con lesiones secundarias mucosas, la opción eficaz es la Anfotericina B; el tratamiento con este último debe realizarse en ambiente hospitalario por su evidente toxicidad⁵.

En la actualidad el uso de plantas medicinales ha apoyado bastante a lo que es el tratamiento de diversas enfermedades en todo el mundo. Bolivia cuenta con una amplia variedad de especies vegetales con propiedades medicinales en todo su territorio, en especial en la región andina, sector norte del departamento de La Paz⁴.

La flora de nuestro país es una de las más ricas y menos estudiadas del mundo. El gran número de etnias poseedoras de un conocimiento original del medio natural permitió realizar estudios biológicos y químicos orientados a valorar el uso de las plantas empleadas para el tratamiento de la Leishmaniasis⁶.

Estudios realizados en la localidad de Palos Blancos – Alto Beni – Bolivia, donde la frecuencia de esta enfermedad es muy alta, demostraron que la Evanta (*Galipea longiflora Krause*), arbusto que crece en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los Departamentos del Beni y La Paz, tiene efecto leishmanicida lo que explica por qué muchos pobladores de la región utilizan dicha planta para tratar este mal⁷.

Además del efecto leishmanicida de Evanta, en otros estudios se ha postulado que la cura podría no solo deberse a la acción sobre el parásito sino también a un efecto paralelo sobre componentes de la respuesta inmune del huésped. Se sugiere que Evanta actúa como un inmunomodulador de la respuesta, estos estudios han sido realizados *in vitro* en células de ratones de la cepa Balb/c tratando dichas células con el extracto de Evanta^{2,8}.

En el presente trabajo se realizó un estudio *in vivo* para evaluar el efecto del extracto total de alcaloides de Evanta (EAE) en ratones hembras de la cepa Balb/c previamente inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* y, posteriormente, evaluar

la reactivación *ex vivo* de células provenientes de dicha cepa a través de la valoración de la Proliferación Celular y producción de Interferón Gamma.

II. MARCO TEORICO.-

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias de distribución mundial transmitidas al ser humano por la picadura de alrededor de 30 especies de flebótomos infectados por protozoos del género *Leishmania*. Esta enfermedad se manifiesta por sus formas: cutánea (localizada y difusa), mucocutánea, y visceral, los cuales son el resultado de la compleja interacción entre la especie del parásito involucrado y la respuesta inmunológica del paciente⁹.

1.- Epidemiología.-

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Leishmaniasis humana es endémica en 88 países del trópico, subtropical y regiones templadas de África, Asia, Europa, Norte y Sud América con un total de 350 millones de personas en riesgo de infección. La prevalencia estimada en todo el mundo es de aproximadamente 12 millones de personas incluyendo a aquellos con sintomatología no aparente. De los 1.5 a 2 millones de casos nuevos que ocurren anualmente solo 600 000 son oficialmente declarados^{2,10}.

En América la Leishmaniasis humana ocurre de México, Centroamérica, a Sudamérica con la excepción de Chile, Uruguay e Islas del Caribe y es causada por 29 especies distintas de leishmania agrupadas en tres complejos que presentan afectaciones que van desde lesiones cutáneas causadas por el complejo **Leishmania mexicana**, a una persistente desfiguración cutánea y manifestaciones mucocutáneas causadas por el complejo **Leishmania braziliensis**, a la enfermedad visceral potencialmente fatal causada por el complejo **Leishmania donovani**^{3,10}.

La forma más frecuente en América es la cutánea. La enfermedad se asocia principalmente con la penetración o residencia cercana de grupos humanos en regiones selváticas. La Leishmaniasis afecta a ambos sexos, aunque se reporta con mayor frecuencia en sujetos del sexo masculino, con aumento en la incidencia a partir de los 9 años de edad¹⁰.

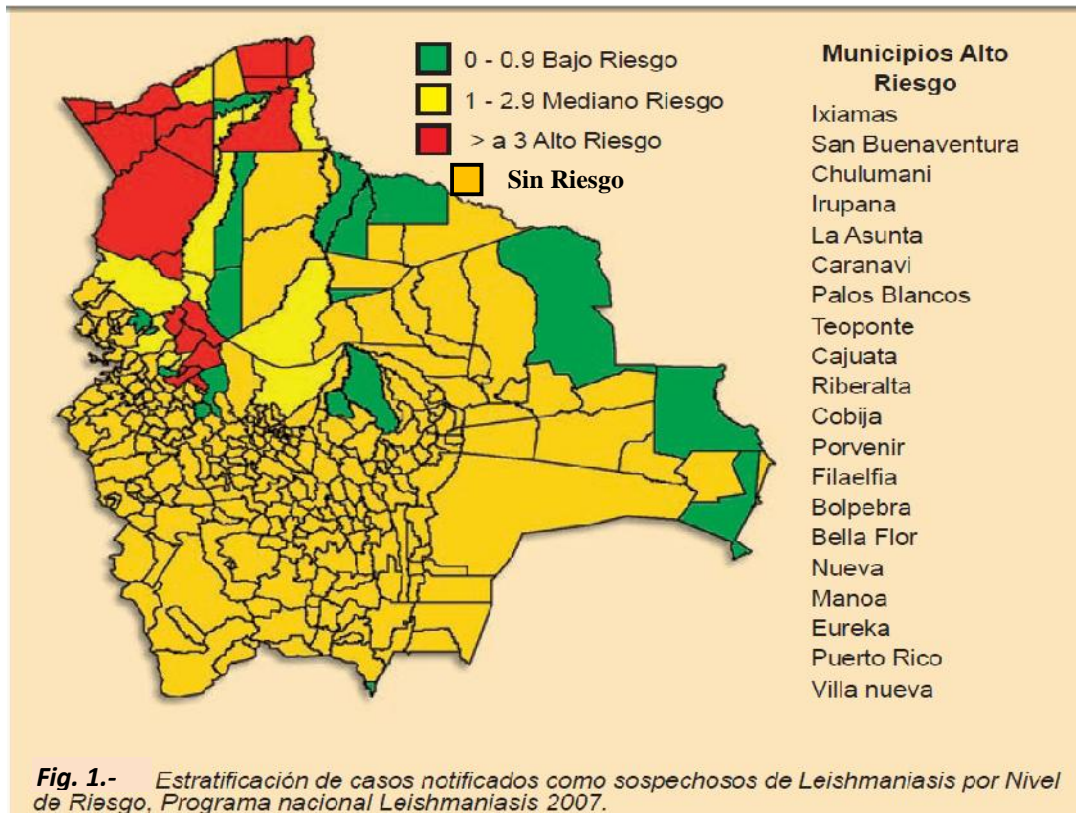
Las zonas geográficas situadas por debajo de los 1750 m sobre el nivel del mar, con clima cálido, humedad relativa alta y temperatura media entre 25 - 30°C presentan las condiciones adecuadas para la transmisión de la enfermedad cutánea y para la proliferación de focos en bosques tropicales donde aún es frecuente la presencia de reservorios y vectores, en tanto que los bosques secos tropicales son el hábitat preferido para la leishmaniasis visceral. Actúan como reservorios los roedores, zorros, animales peri domésticos; los perros tienen gran importancia por su estrecha relación con el humano¹⁰.

Los vectores se desplazan a "saltos", a cortas distancias de sus criaderos; se ubican en el suelo, troncos de árboles, hojas de pequeños arbustos, madrigueras de mamíferos, cerca de arroyos y ríos; también es posible encontrarlos en las paredes húmedas de viviendas, en gallineros, chiqueros. La infección es adquirida sobre todo en estación de lluvias, a causa del incremento en la densidad de los transmisores, cuando el hombre entra o reside en las áreas ecoepidemiológicas adecuadas. Los factores de riesgo en zonas endémicas son la exposición debida a actividades laborales (campesinos, militares, chicleros, madereros, arqueólogos); la instalación de viviendas cerca de focos de transmisión y de ciudades cercanas a bosques y/o selvas tropicales¹⁰.

Enfermedades protozoarias tales como la leishmaniasis, son la causa de una considerable mortalidad y morbilidad alrededor del mundo³. La mortalidad es uno de los indicadores que no se ha estudiado en nuestro país, pero si se tiene referencia de personas con procesos crónicos avanzados de Leishmaniasis muco cutánea, los cuales tienen un compromiso psicológico importante que hace que se aísle de la sociedad (muerte psicológica), no pudiendo desempeñarse adecuadamente en su trabajo (muerte laboral), posteriormente es rechazado por su familia, luego por su comunidad y sociedad (muerte social)⁵.

La importante migración de la zona andina a la zona tropical y la explotación predatoria del bosque tropical son dos de las principales causas que condicionan la aparición de nuevos focos de la enfermedad, haciendo que cada vez tengan mayor expansión geográfica y mayor magnitud, cobrando notable importancia en la Salud Pública,

tanto así que el área endémica llega a más del 70% del territorio boliviano. Los municipios que mayor número de casos reportaron hasta el 2007 son Chulumani (323 casos), La Asunta (315 casos), Riberalta (286 casos), Palos Blancos (278 casos), Caranavi (274 casos), Cobija (124 casos) ⁵.



2. Leishmaniasis.-

2.1. Etiología.-

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa provocada por un parásito denominado leishmania. Esta enfermedad conocida comúnmente como «úlceras del chiclero» o «picadura de la mala mosca» es causada por un protozoo de la familia Trypanosomatidae (género Leishmania) que afecta en nuestro medio, principalmente al perro y al hombre. Se transmite por la picadura de hembras del mosquito flebótomo, chupadoras de sangre pertenecientes a la familia Psychodidae. La hembra de éste, pica al

animal o persona contagiada con leishmania, ingiriéndola con la sangre que succiona. Una vez en el interior del insecto, la leishmania continúa su ciclo de maduración, para posteriormente, cuando éste vuelva a picar a otra persona, infectarla e iniciar el proceso infeccioso¹. Como es un patógeno intracelular, *Leishmania* se reproduce exclusivamente en el macrófago; después de ser fagocitado se retiene en las vesículas del citoplasma de donde escapan evadiendo el sistema de defensa del huésped, proliferan causando lisis de las células del hospedador y, finalmente, la infección de los macrófagos circundantes. El estado del hospedador (edad, salud y estado inmunológico) y las especies infectantes de *Leishmania*, son los dos factores principales que determinan las manifestaciones patológicas de la enfermedad¹¹.

La transmisión entre humanos también puede ocurrir por contacto con material de una lesión, trasplante de órganos, transfusión sanguínea y a través de la placenta de madre a hijo¹.

2.1.1. Leishmania.-

Leishmania spp. incluye a una serie de protozoos flagelados pertenecientes al subphylum *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae*. El género *Leishmania* ha sido dividido en dos subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Viannia*), de acuerdo al sitio de desarrollo de los parásitos en la mosca transmisora. Las especies y subespecies se agrupan dentro de complejos: *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) donovani*¹⁰.

Se han descrito 29 diferentes especies de *Leishmania*, de estas especies, 21 se han aislado en humanos y son responsables de producirles las diferentes formas de *Leishmaniasis* con manifestaciones clínicas muy variadas. En Bolivia se han podido aislar e identificar la circulación de diferentes especies:

- *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*
- *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*
- *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*
- *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*⁵.

Las diferentes especies de *Leishmania* no se pueden identificar por su morfología. La clasificación se hace en función de sus características:

- 1) Biológicas, desarrollo en el flebótomo, crecimiento en medios de cultivo, desarrollo en los hospederos vertebrados
- 2) Bioquímicas: patrones isoenzimáticos, análisis del DNA nuclear y del cinetoplasto
- 3) Inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales, entre otras¹⁰.

a) Morfología.-

Leishmania es un protozoo intracelular obligado dimórfico; en los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (células de Langerhans en la piel). Otras células como monocitos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, son capaces de albergar parásitos de *Leishmania*¹⁰.

El **Promastigote (metacíclico) es la forma infectante**; es elongado, extracelular, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores, pertenecientes al género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África).



**Fig. 2. Extendido de promastigotes axénicos en cultivo:
Tinción Giemsa *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903)
Fuente Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas.**

Mide 10 - 20 μm , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15- 25 μm ; presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato

de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1 - 2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo. El axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar¹⁰.

El **Amastigote, la forma replicativa**, reside y se multiplica dentro de las células del sistema de defensa de los tejidos (piel, hígado, bazo, medula ósea), en el fagolisosoma dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos; es redondo u oval, intracelular, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel.

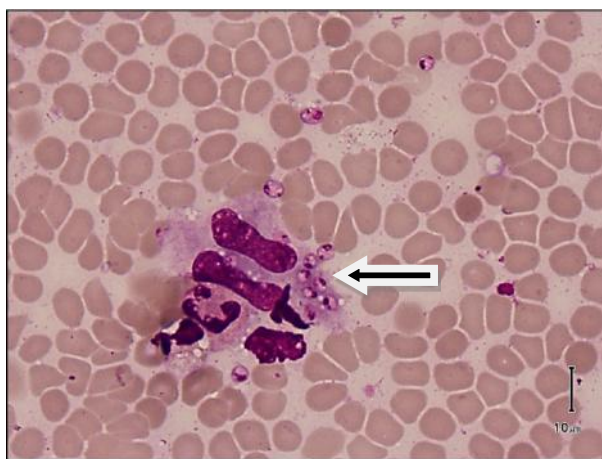


Fig.3. Leishmania sp. Amastigotes en macrófago.
Fuente: Laboratorio de Parasitología. Instituto SELADIS

Mide 2 - 4 μm ; con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que une cinetoplasto y cuerpo basal, éste último apenas un punto visible. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. La presencia del cinetoplasto da el nombre al grupo de protozoos incluidos en el orden *Kinetoplastida*¹.

2.1.2. Ciclo biológico.-

Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida dimórfico que implica a los vectores flebótomos y a los hospedadores vertebrados¹³.

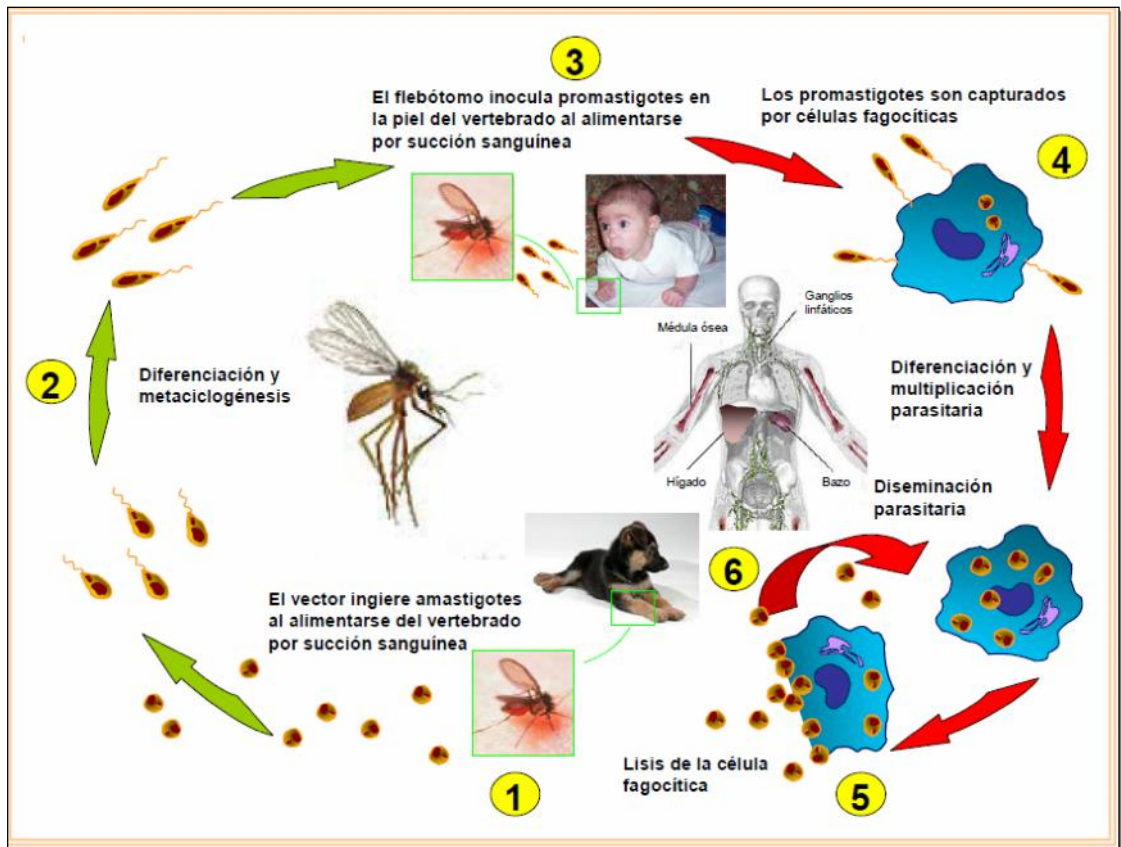


Fig. 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fuente: Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular

El ciclo comienza a partir de que la hembra de los flebótomos pica para alimentarse, la sangre ingerida con parásitos (amastigotes) llega al tubo digestivo medio del díptero, donde se diferencian inmediatamente en otra fase parasitaria, (promastigotes procíclicos), formas flageladas no infectivas y con capacidad de división que se unen al epitelio digestivo impidiendo ser excretados. *Leishmania* es capaz de sobrevivir dentro del tubo digestivo del vector gracias a que la diferenciación a promastigotes procíclicos implica un aumento de la expresión en superficie de grandes cantidades de

lipofosfoglicano (LPG) así como de otros glicoconjugados como la metaloproteasa gp63. Este mecanismo confiere al parásito una alta protección frente al ambiente hostil generado dentro del tubo digestivo del flebótomo por la liberación de enzimas hidrolíticas. A través de un proceso denominado metacicloogénesis, los promástigotes procíclicos pierden la capacidad de división y adquieren virulencia transformándose en promástigotes metacíclicos que se separan del epitelio digestivo y migran hacia la cavidad buco-faríngea. El tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente 10 días. De esta forma, en el siguiente proceso de alimentación por succión sanguínea (picadura), el flebótomo hembra liberará junto con su saliva los promástigotes metacíclicos (entre 10 a 100 parásitos) dentro de un hospedador vertebrado los que ingresan por la piel, los parásitos se adhieren a receptores de la superficie de los macrófagos de la piel y son fagocitados formándose un fagosoma, en el interior del cual los promástigotes se transforman rápidamente en amastigotes. Al fagosoma se unen los lisosomas pero los parásitos pueden resistir la destrucción y se multiplican rápidamente hasta lisis al macrófago. Posteriormente invaden macrófagos adyacentes y se diseminan por vía linfática y sanguínea, pudiendo llegar así a las mucosas oro-nasofaríngeas o a los órganos del sistema fagocítico mononuclear ^{5,12}.

Los diferentes antígenos de *Leishmania* spp. inducen tanto una respuesta inmune mediada por células como una respuesta inmune humoral. Sin embargo, la resolución de la infección y/o enfermedad depende principalmente de mecanismos de respuesta inmune mediada por células T. La respuesta inmune del hospedero varía ampliamente según las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis. Es así como en las formas cutáneas o mucosas ocurre una fuerte respuesta de inmunidad celular, con bajos títulos de anticuerpos, mientras que en la leishmaniasis cutánea difusa y leishmaniasis visceral la respuesta celular está ausente, pero aparecen títulos de anticuerpos altos o moderados, fundamentalmente de clase IgG. Después de la invasión del parásito al macrófago, éste presenta en su membrana antígenos del parásito, los cuales estimulan la proliferación de células Th₁ y éstas a su vez secretan un patrón definido de citoquinas que las diferencia en dos subpoblaciones de células Th: las células Th₁ y las células Th₂, cada una de ellas

con funciones efectoras diferentes. La subpoblación de células Th₁ se caracteriza por secretar citoquinas tales como Interferón - gamma (INF-), Interleucina – 2 (IL-2) y linfotóxina (TNF-), mientras que las células Th₂ secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las citoquinas de tipo Th₁ participan en la regulación del granuloma y en la activación de macrófagos inflamatorios para aumentar su capacidad microbicida, mientras que las citoquinas de tipo Th₂ regulan la producción de anticuerpos por los linfocitos B y el desarrollo de una respuesta inmune de tipo humoral. Actualmente, se desconocen los factores exactos que dirigen o determinan la expansión de una u otra subpoblación de células Th. Sin embargo, se ha observado que cuando existe una gran cantidad de antígeno, cuando éste es soluble o cuando el linfocito B se comporta como célula presentadora, la respuesta es de tipo Th₂. Al contrario, la presencia de poco antígeno, presentado por macrófagos o células dendríticas lleva a una respuesta de tipo Th₁¹³.

2.2. Reservorio.-

Es un mamífero vertebrado de una especie determinada que alberga a una especie de Leishmania en un foco ecológico dado que juega un rol importante en el ciclo del parásito. Los reservorios identificados son: ratones, ratas, oso hormiguero, perezoso, zarigüeyas, asno, caballo; la infección en estos, suele ser benigna e inaparente, el reservorio doméstico principalmente es el perro que presenta una infección virulenta con lesiones en mucosas y grandes daños orgánicos que generalmente les produce la muerte⁵.

2.3. Vector.

Los insectos vectores pertenecen a varias especies de flebotomídeos de diferentes géneros (Psychodopygus y Lutzomyias), los insectos miden menos de 5mm, tienen patas largas y cuerpo jorobado, está cubierto de pelos, en reposo mantiene sus alas paradas, los sexos se diferencian fácilmente al observar el extremo posterior del abdomen, las hembras son hematófagas y solamente algunas especies son transmisoras de la enfermedad.



Fig.5. *Lutzomyia longipalpis*. En América



Fig.6. *Phlebotomus* sp. Viejo Mundo

Fuente: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

La hembra de los flebótomos necesita ingerir sangre que es la fuente de proteína para la maduración de sus huevos, el flebótomo es atraído por el huésped por la emisión de dióxido de carbono, ácido láctico y la luz que viene de las viviendas, estas se vuelven agresivas cuando el humano interrumpe los sitios donde está en reposo⁵.

2.4. Aspectos clínicos.-

Las manifestaciones clínicas son variables y están relacionadas a la cepa de leishmania infectante, el medio ambiente y a la respuesta inmune del hospedero.

La infección por *Leishmania* ocasiona daño tisular en la piel llamado Leishmaniasis cutánea que puede afectar las membranas mucosas de diferentes maneras ó, con más frecuencia, producir úlceras cutáneas en el sitio de la picadura. La *Leishmania* puede también ocasionar una enfermedad sistémica o leishmaniasis visceral con complicaciones mortales. En este caso, cuando el mosquito pica, este parásito ingresa al cuerpo y migra a la médula ósea, al bazo y a los ganglios linfáticos¹.

Signos y Síntomas:

a) Leishmaniasis visceral:

- Fiebre persistente y de larga duración (semanas) con ciclos irregulares
- Sudoración nocturna

- Fatiga
- Debilidad
- Malestar abdominal vago
- Pérdida de apetito (anorexia)
- Pérdida de peso
- Vómito (en los niños)
- Diarrea (en los niños)
- Tos (en los niños)
- Piel escamosa
- Piel grisácea, oscura, pálida
- Adelgazamiento del cabello
- Esplenomegalia
- Hepatomegalia (menos común que la esplenomegalia)
- Agrandamiento de los ganglios linfáticos (menos común que la esplenomegalia)¹.

b) Leishmaniasis cutánea:

- Mácula o pápula eritematosa
- Úlcera cutánea, que se forma en el área de la lesión original
- Úlcera que sana muy lentamente, en cuestión de meses
- Pueden formarse lesiones más pequeñas alrededor de la úlcera (lesiones satélites)
- Obstrucción nasal
- Goteo nasal (coriza)
- Hemorragia nasal o epistaxis
- Úlceras y erosión tisular (boca, lengua, encías, labios, nariz, y tabique nasal)
- Dificultad para deglutir (disfagia) con compromiso esofágico
- Dificultad para respirar por compromiso traqueal¹.

2.5. Formas clínicas.-

Se han descrito al menos 3 formas clínicas de Leishmaniasis: Leishmaniasis cutánea (LC), Leishmaniasis mucocutánea (LMC) y Leishmaniasis Visceral (LV). A continuación se describe cada una de ellas:

2.5.1. Leishmaniasis cutánea (LC).-

Los principales agentes causales en América son *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. El Periodo de incubación está entre 2 y 3 semanas. La localización de las úlceras primarias son más frecuentes en las partes expuestas del cuerpo donde las Lutzomyias pueden picar (miembros superiores, inferiores y cara). La leishmaniasis cutánea se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunológicas. Diferentes estudios tanto en modelos experimentales como en humanos han demostrado que la inmunidad mediada por células está relacionada con la resistencia y susceptibilidad a esta enfermedad ¹⁴.

Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) ¹⁰.

a). Leishmaniasis cutánea localizada (LCL).



Fig.7 y 8. Leishmaniasis cutánea.
Fuente: “Proyecto Enfermedades Infecciosas”

Generalmente circunscrita al sitio de inoculación, gracias a una respuesta inmune celular protectora. Se ha observado como signo precoz, la aparición de nódulos linfáticos en la región correspondiente. El inicio de los signos linfáticos puede aparecer antes, al mismo tiempo o después de la ulceración, y, en casos muy raros, puede ser el único signo de infección de leishmaniasis. Después de varios días, la lesión inicial se ulcera espontáneamente y se cubre de un exudado amarillento y adherente, que dará lugar a la costra. Debajo de la costra, la lesión se extiende en superficie y profundidad. Pueden aparecer lesiones satélites que al unirse a la inicial, originan una úlcera grande, en el lugar de la picadura aparece una pequeña macula o mancha eritematosa, pruriginosa que en días se transforma en una pápula de menos de 5mm que secreta un exudado seroso generalmente por el rascado (intenso prurito y leve dolor que ocasiona la picadura), se empieza a convertir en una pequeña úlcera que no cura con el tratamiento convencional, al paso de los días la úlcera puede crecer en tamaño y profundidad hasta alcanzar un diámetro promedio de 4 a 6 cm, es de forma redondeada u oval con bordes bien definidos, elevados y levemente indurados^{5,10}.

b). Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD).



Fig. 9 y 10. Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada.

Fuente: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

Caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la diseminación no controlada en piel, presenta lesiones nodulares con gran número de parásitos diseminados prácticamente en todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, regiones inguinal y axilar, genitales externos, plantas y palmas, aunque se han reportado excepciones. La enfermedad es de curso crónico, pueden presentar resistencia a los tratamientos, se asocia a recaídas y a infecciones bacterianas secundarias. Se considera un problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica y porque puede llegar a producir lesiones destructivas e incluso discapacitantes. La respuesta inmune predominante no protectora, es de tipo Th₂. En la biopsia de la lesión, se identifican macrófagos vacuolados con abundantes amastigotes¹⁰.

2.5.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).-



Fig.11 y 12. Leishmaniasis mucocutánea.

Fuente: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

El progreso de la enfermedad es crónico, después de años de la cicatrización de la lesión primaria (puerta de entrada del parásito), y mas raramente a los meses en forma conjunta cuando las lesiones primarias son muy cercanas a las mucosas, se producen lesiones en la mucosa nasal. Las lesiones en tabique nasal son, por lo general, ulcerativas y pruriginosas con emisión de mucus con sangre; la lesión en el tabique comienza a crecer

hasta perforar el mismo. Toda la región se vuelve eritematosa y presenta un grado leve de edema. A medida que la enfermedad avanza va tomando tabique nasal provocando destrucción de la nariz, además toma labio superior, paladar, invade úvula, epiglotis, cuerdas vocales faringe y laringe, causando dolor, ardor y problemas en la fonación y deglución e incluso asfixia^{5,10}.

En un tercio de los casos, las manifestaciones mucosas son primarias, sin antecedente de lesión cutánea. Posiblemente la infección primaria ha sido inaparente o se ha manifestado como una lesión mínima que pasó desapercibida para el paciente¹⁰.

La infección bacteriana secundaria es frecuente y complica el cuadro. Presenta resistencia a la quimioterapia específica. No es usual en niños, pero cuando ocurre, la mortalidad es alta. Las lesiones presentan escasos parásitos. La respuesta inmune predominante es de tipo Th₁¹⁰.

2.5.3. Leishmaniasis visceral (LV).-

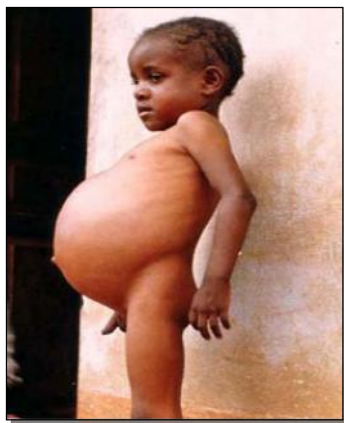


Fig.13 y 14. Leishmaniasis Visceral. Hepatoesplenomegalia

Fuente: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

Los parásitos que causan la L.V. pertenecen al complejo *Leishmania donovani*, el cual incluye las especies *L. donovani* en el subcontinente hindú, Asia y África, *L. infantum* en el Mediterráneo y *Leishmania infantum/L. chagasi* en Sudamérica¹⁵.

En los niños, la infección sistémica empieza regularmente de una manera súbita con vómitos, diarrea, fiebre y tos. En los adultos, se presenta una fiebre que dura de 2 semanas a 2 meses acompañada de síntomas no específicos como fatiga, debilidad y pérdida del apetito. La debilidad aumenta con la progresión de la enfermedad y la piel puede tornarse grisácea, oscura, reseca y escamosa. Los histiocitos tienen numerosos amastigotes intracelulares, en algunos casos se ha informado lesión ulcerativa en el sitio de entrada del parásito. Los ganglios linfáticos regionales están aumentados de tamaño y también contienen parásitos. Al diseminarse, se compromete todo el sistema reticuloendotelial del organismo. Los órganos más afectados son: bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos¹⁴. Los parásitos deterioran el sistema inmune al reducir el número de células que contrarrestan las enfermedades, ocasionando frecuentemente la muerte que se presenta como resultado de complicaciones de otras infecciones y no como resultado de la enfermedad misma. Los cuadros agudos son menos frecuentes y, cuando se manifiesta, la enfermedad es grave con una mortalidad sin tratamiento del 100%¹⁰. La muerte frecuentemente se produce en un período de dos años¹.

2.6. Tratamiento.-

La administración oportuna y completa del tratamiento tiene por objeto eliminar el parásito de las lesiones y evitar así la cronicidad y las complicaciones, coadyuvando al control de la enfermedad⁵. El arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de Leishmaniasis, así como de otras enfermedades tropicales es bastante precario¹⁶.

El tratamiento disponible para la Leishmaniasis está basado en compuestos antimoniales pentavalentes: Estibogluconato de sodio (Pentostam) y antimoniato de meglumina (Glucantime), este último, si se administra de forma continua y en la posología adecuada, resulta eficaz en el tratamiento de los tres grupos de Leishmaniasis. A su vez, bajas dosis y tratamientos discontinuos conllevan a fallas en la terapia y en la aparición de formas resistentes^{10, 12, 16}.

Sin embargo, estos compuestos presentan una eficacia limitada y son altamente tóxicos por lo que requieren de un control clínico cercano y frecuente debido a los diversos

efectos secundarios significativos entre los que destacan: alteraciones en la función hepática, pancreatitis bioquímica, aplanamiento de ondas T en el Electrocardiograma (E.C.G.), mialgias, artralgias, trombocitopenia y otros. Además, estas drogas son extremadamente costosas para los países en los cuales la enfermedad es endémica. El mecanismo de acción de estos compuestos no está totalmente claro pero se piensa que interfieren con las rutas metabólicas del parásito^{10, 12, 16}.

Para los pacientes con fracaso terapéutico o con lesiones mucosas secundarias, la opción eficaz es la Anfotericina B, este tratamiento debe realizarse en un ambiente hospitalario por su evidente toxicidad. Estudios clínicos con una forma liposomal de Anfotericina B (Ambisome), mostraron que es menos tóxica y presenta menos efectos adversos que la forma inyectable convencional, reduciendo considerablemente su nefrotoxicidad^{5,16}.

Otros fármacos sistémicos parenterales utilizados son: Pentamidina, Paromomicina y Sitamaquina (en evaluación clínica). Entre los fármacos orales, se han empleado: Miltefosine, un antineoplásico con efecto teratogénico, aceptado en la India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y en América para tratar lesiones cutáneas y mucocutáneas (aún en evaluación clínica), ketoconazol e Itraconazol. Los fármacos mencionados son tóxicos y tienen un alto costo. Asimismo, se han utilizado ungüentos de Paromomicina e Imiquimod (antiviral con características inmunomoduladoras), empleado conjuntamente con antimoniales¹⁰. La frecuencia incrementada de los casos de resistencia química y la toxicidad elevada a estos fármacos muestra claramente la necesidad de encontrar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la Leishmaniasis².

El reino vegetal es considerado como fuente de productos naturales con valor medicinal o de precursores útiles para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Gracias a que estos productos naturales son de fácil acceso y menos tóxicos, se han convertido en una excelente alternativa terapéutica¹. Debido a que las plantas medicinales tienen un gran potencial terapéutico se constituyen en una fuente importante de productos naturales para mitigar las enfermedades propias, principalmente de los países en vías de desarrollo. En muchos países, los tratamientos accesibles contra Leishmaniasis siguen

basándose en el uso de medicina tradicional con hierbas. Desafortunadamente muchos de estos no han sido explorados totalmente. Este es el caso de *Galipea longiflora*, conocida localmente como Evanta, la cual es utilizada en Bolivia para el tratamiento de Leishmaniasis y otras enfermedades parasitarias².

En 1987, investigadores franceses y bolivianos demostraron que los alcaloides presentes en corteza, raíces y hojas de Evanta son los responsables de una importante actividad leishmanicida. Entre 1989 y 1990, estos investigadores, identificaron 13 alcaloides activos identificados espectrofotométricamente como alcaloides quinoleínicos responsables de esta acción⁴. Sin embargo, el efecto de este producto en otros sistemas, que pudiera reforzar su efecto terapéutico, aún no ha sido explorado. Tal es el caso de los posibles efectos sobre el aparato inmune, el cual es responsable tanto de eliminar al parásito como de generar el daño tisular inflamatorio de tipo granulomatoso propio de esta enfermedad.

2.6.1. Evanta.-

Galipea longiflora Krause, comúnmente conocida como Evanta o *Yuruma huana epuna*, es un árbol de hasta 3 a 4 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con un pecíolo frecuentemente alado, flores en cimas, panículos o racimos zigomorfas más o menos vistosas. Este género cuenta con unas 40 especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y al sur del Brasil. Se encuentra en bosques húmedos de la llanura y montaña (350 – 600 m) en el Beni, Ballivián, Misión Fátima, en La Paz en Sud Yungas, Alto Beni y Popoy⁴.

La clasificación botánica es la siguiente:

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: *Galipea*, en la actualidad *Angostura*

Especie: *longiflora* Krause

Nombre común: Evanta

Usos tradicionales: Leishmanicida, anti-anémico, vermífugo y amebicida⁴.

Esta planta se encuentra registrada en farmacopeas tradicionales, como planta medicinal en la cura de la “lepra blanca” como también se conoce a la Leishmaniasis o de problemas digestivos. Esta actividad puede ser interpretada por la medicina occidental, como antiparasitaria (leishmanicida y amebicida). La Evanta es usada de manera tradicional por las etnias Tacana, Mosekene y Tsimane. El uso tradicional más frecuente según los Tacanas es en forma de cocción para el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos. Para el tratamiento de la Leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente en forma de cataplasma sobre las úlceras, dos veces al día hasta que sane, además de beber la decocción¹⁷.

3.- Inmunidad.-

Los virus, bacterias y parásitos son agentes infecciosos capaces de ejercer diversas interacciones con los hospederos que infectan, algunas de las cuales afectan a células, tejidos y órganos manifestando el poder patógeno que poseen. En este tipo de interacciones, que conducen al desarrollo de la enfermedad, participan factores propios del agente infeccioso, del hospedero y del ambiente en el que actúan. Los factores dependientes del hospedero ejercen su acción a través de mecanismos de inmunidad natural o inespecíficos y de mecanismos específicos o de inmunidad adaptativa¹⁸.

Entre los mecanismos de inmunidad natural o inespecíficos que tienen importancia en el control de las infecciones están: la fagocitosis, la acción del sistema de complemento, las células NK, las barreras cutáneas y de las superficies epiteliales y otros¹⁸.

Los mecanismos de inmunidad específica tanto humoral como celular serían de escasa o nula utilidad si no contaran con los mecanismos de inmunidad natural¹⁸.

La evolución de las enfermedades infecciosas comprende una secuencia de interacciones entre el microorganismo y su hospedero. Éstas incluyen: entrada, invasión y colonización de los tejidos por el microorganismo, evadiendo al mismo tiempo los mecanismos inmunes del hospedero¹⁸. Por su parte, el hospedero desarrolla diversos

procesos que pueden conducir a la eliminación del agresor y/o al daño tisular que caracteriza a las lesiones propias de las diferentes enfermedades infecciosas.

3.1. Respuesta inmune en enfermedades parasitarias.-

Debido a su gran difusión y alta frecuencia, las enfermedades parasitarias constituyen un problema médico importante que se acentúa en las zonas tropicales y subtropicales; la gran complejidad de sus estructuras y de su variabilidad biológica, hace que muchos de los mecanismos inmunológicos no sean muy bien conocidos. Las principales características de la respuesta inmunológica frente a los parásitos, que las diferencian de la respuesta frente a bacterias o virus, se puede resumir en los siguientes puntos:

- Los parásitos están formados por una gran cantidad de antígenos debido a su tamaño y complejidad estructural.
- Los parásitos infectan solo algunas especies de hospederos y no a otras. Estos organismos a menudo requieren “señales fisiológicas” provenientes del hospedero para guiar su desarrollo ontogénico (eclosión de los huevos, muda de cutícula, migraciones, etc.). Si ellos invaden una especie de hospedero que no posee las señales adecuadas, la invasión fracasa (no existe susceptibilidad) o el parásito no completa su desarrollo¹⁸.
- El parásito suele vivir durante largos periodos de tiempo en su huésped, induciendo una estimulación antigénica prolongada (cronicidad) dando como resultado a veces un daño por hipersensibilidad, es decir que la propia respuesta inmune favorece el daño tisular más que la infección misma, con activación de gran número de mecanismos inmunitarios tanto de tipo humoral como celular; dentro de ellos, los anticuerpos y los mecanismos citotóxicos juegan el papel más importante¹⁸.
- Los parásitos desarrollan diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune o al menos para que no sea suficientemente eficaz. Entre ellos: el cambio en su estructura antigénica en los diferentes ciclos parasitarios y/o biológicos (generan nuevos antígenos en cada ciclo), la modificación de los antígenos de superficie,

las infecciones intracelulares sin cambios en la membrana de la célula parasitada y otros^{19, 20}.

Hay que señalar que la acción del sistema inmune es tan variada como los diferentes agentes parasitarios. Así, habrá una gran diferencia en la respuesta frente a un parásito protozoo intracelular, como podría ser el caso de *Leishmania*, y lo que sería una reacción frente a un ectoparásito artrópodo, como por ejemplo una garrapata²⁰.

Después de una primera exposición al agente infeccioso, transcurre un tiempo hasta que se monta una respuesta antígeno-específica. Durante este lapso, la defensa recae en una serie de mecanismos locales y sistémicos mediados por factores humorales y celulares. En el sitio de ingreso de los parásitos, sobre todo si penetran por piel, se registra una reacción local que sirve para limitar la diseminación y, a la vez, facilita el acceso de células inflamatorias dando lugar al gatillado de una serie de reacciones sistémicas como fiebre, leucocitosis, producción de proteínas de fase aguda, activación de mecanismos microbicidas por los fagocitos, etc. Entre las proteínas de fase aguda, la Proteína C Reactiva actúa como opsonina colaborando en la fagocitosis del patógeno; el complemento puede también favorecer la fagocitosis de algunos parásitos, además, en algunos de ellos (o en algunos de sus estadios) existen en su membrana externa factores activadores de la vía alterna del complemento que conducen a su destrucción, sin requerir anticuerpos¹⁹.

La primera línea de defensa celular frente a los parásitos está conformada por macrófagos, neutrófilos y eosinófilos así como por las citoquinas ligadas a la respuesta innata como: IL-1, IL-6, IL-12 y Factor de Necrosis tumoral (TNF). En definitiva, los mecanismos fagocíticos están ligados a las fases iniciales de la infección parasitaria²¹. La llave que conecta la respuesta inespecífica con la específica es la secreción de Interferon Gamma (INF- γ) e IL-4 que inducen y modulan la actividad de los linfocitos Th₁ y Th₂, estas dos subpoblaciones se diferencian por las citoquinas que producen. El tipo de subpoblación estimulada por un parásito es producto de sus características, entre ellas destaca el modo de interacción con su huésped. En función de que predomine una u otra subpoblación, se estimulará más eficientemente un tipo de respuesta que conducirá

a una efectiva activación macrofágica (Th₁) con producción de TNF e INF- γ , o deficitaria en activación macrofágica (Th₂) con producción de IL-4, IL-5 e IL-10, inducción de la proliferación de linfocitos B, producción exacerbada de Inmunoglobulina E (IgE) y activación de mastocitos y eosinófilos. En general, la resistencia contra parásitos intracelulares está asociada a Th₁ y la de parásitos extracelulares a Th₂. Sin embargo en la mayoría de las parasitosis se estimulan ambos mecanismos, aunque con diferente preponderancia y la relación entre ambos puede variar con el progreso de la infección ya que ambas poblaciones se interregulan negativamente¹⁹. Asimismo, la inducción de una respuesta no apropiada (Ej. Th₂ en parasitosis intracelulares) puede conducir a una falla con consecuencias graves en la evolución de la enfermedad.

3.2. Respuesta inmune en Leishmaniasis.-

El sistema inmune es crucial en el control de la infección por Leishmania. La inmunidad mediada por células juega un rol central en la respuesta a patógenos intracelulares².

La respuesta inmune ante la infección por Leishmania se inicia con la respuesta innata: Los receptores TLR2 (Toll-like receptor 2), presentes en macrófagos, células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK) reconocen moléculas en la superficie del parásito, tales como el lipofosfoglicano (LPG) y una glicoproteína de 63kDa (gp63) e inducen la producción de citoquinas pro inflamatorias: TNF- γ , IFN- γ e IL-12, así como de moléculas coestimuladoras¹⁰.

Los factores del complemento C3b y C3bi se unen al parásito y median la adhesión y posterior fagocitosis a través de la unión de los receptores del complemento CR1 y CR3 presentes en el macrófago.

El macrófago cumple un papel triple en la enfermedad:

- Es la célula hospedera
- Es la célula presentadora de antígenos que activa a las células T específicas

- Es la célula efectora cuya eficacia leishmanicida depende de la activación por parte de las citoquinas IFN- y TNF- provenientes de los linfocitos Th₁ y de células asociadas¹⁰.

Algunos parásitos son eliminados por la lisis del complemento y los que escapan son fagocitados y englobados por la vacuola parasitófora donde evolucionan a amastigotes, en el ambiente ácido del fagolisosoma. El Amastigote sobrevive gracias a la enzima gp63 cuya actividad proteolítica a pH ácido le permite degradar enzimas lisosomales. El LPG protege al parásito del estallido respiratorio mediante el secuestro de aniones superóxido, radicales hidroxilo y la inhibición de una actividad de la proteína cinasa-C, relevante en el estallido respiratorio. Estos amastigotes infectan a células dendríticas y a otros macrófagos en los que se multiplican por división binaria; la progenie liberada, tras la muerte celular, infectará a nuevas células para dar lugar a la inflamación¹⁰.

Al parecer, las células que permanecen vivas e infectadas son las responsables de inducir la respuesta inmune específica, puesto que ellas, posiblemente, presentan los antígenos de Leishmania a los linfocitos T. El linfocito T que interactúa con los antígenos presentes en la membrana de la célula infectada, (macrófago y células dendríticas), prolifera y produce IFN- e IL-2. Estas citoquinas y otras producidas por las células fagocíticas tales como TNF- y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSF) activan a la célula infectada para que sea ella la que destruya y elimine los amastigotes que tiene en su interior¹³.

La respuesta mediada por células cumple un papel protector contra las infecciones por Leishmania. La respuesta específica de células T es la que se asocia con el control de la infección y la resolución de las lesiones¹³.

Una vez que los Macrófagos y células dendríticas interaccionan con los linfocitos T, estos secretan IL-12 que activan a las células Th₁ que secretan INF- y facilitan la curación. Los linfocitos T activados secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que actúan en las células Th₂ activándolas y liberan IL-4 e IL-5 que actúan activando los linfocitos B, estos se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos responsables de la inmunidad humoral adquirida y son los que actúan en la inflamación (Enfermedad) al

facilitar la captación de los promástigotes por las inmunoglobulinas fijadas en los macrófagos, facilitando la opsonización²².

Un estudio experimental, mostró que el progreso de la infección, demostrado en el modelo *Leishmania*-ratón, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4+ hacia las vías Th₁ asociadas con lesiones que se auto limitan o a Th₂ con lesiones crónicas diseminadas y eventualmente la muerte. En los ratones que naturalmente resuelven sus lesiones la IL-12 induce la expansión de clonas Th₁ con la elaboración de diferentes perfiles de citoquinas como IL-2, IFN- γ y TNF- α , que inducen la producción de óxido nítrico (NO) en el macrófago, mientras que en los ratones susceptibles, la IL-4 e IL-10 determinan la diferenciación hacia clonas Th₂ (activación policlonal de células B), y la producción de citoquinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y TGF- β .

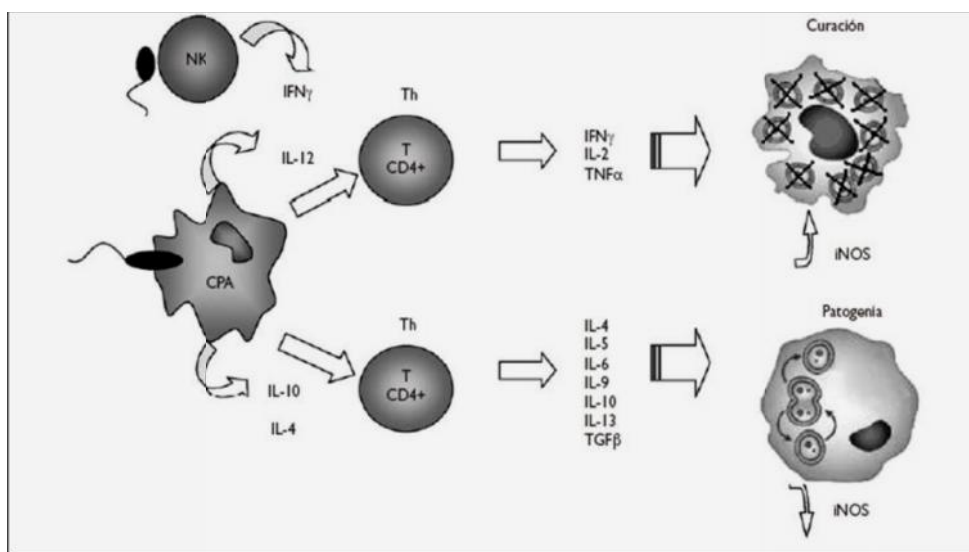


Fig.15. Reacción inmunitaria a leishmania.

Fuente: Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Aunque la respuesta inmune tipo Th₁ protege contra la mayor parte de formas de Leishmaniasis, parece ser que algunos tipos de respuesta inmune dirigida contra *Leishmania* pueden llevar a una forma clínica más severa de la enfermedad, mientras que en otras llevan a la resolución de la infección con poca patología, como la

Leishmaniasis cutánea. Los datos proveen evidencia que una inadecuada modulación de una respuesta Th₁ puede producir una expansión clonal exagerada de células T reactivas, dichas células pueden estimular la producción de IFN- que puede llevar a una reacción exagerada que genera daño tisular por acumulación de células mononucleares (granuloma), con lo que contribuye a la inmunopatogénesis².

Varios estudios han analizado la expresión de genes intralesionales en Leishmaniasis cutánea. En ésta, causada por *L. braziliensis*, el IFN- fue preferentemente expresado en las lesiones localizadas, mientras que IL-4, IL-5 e IL-10 fueron detectadas en las formas mucosas y difusas de la enfermedad. En cambio, en pacientes infectados con *L. mexicana*, niveles elevados de IL-10 e IFN- fueron expresados. La IL-13 que comparte funciones con IL-4 ha sido detectada en la mayor parte de pacientes con Leishmaniasis causados por *L. guyanensis*⁸.

3.2.1. Proliferación Celular.-

Es un proceso de replicación celular por el cual se produce la expansión del clon linfocitario que reconoce específicamente un antígeno concreto. El sentido biológico de la proliferación linfocitaria, en el contexto de la respuesta inmunitaria, es generar una progenie de células específicas para un antígeno, suficientemente numerosa como para eliminar eficazmente dicho antígeno²⁴. Existe un punto controversial referente a la generación de células de memoria durante la expansión clonal del cual se han planteado dos hipótesis:

a) Las células T CD8, son inducidas a dividirse, y progresivamente diferenciarse en células citotóxicas efectoras y en células de memoria después de cada encuentro con el antígeno. En base a este modelo, la división y diferenciación de las células T CD8 activadas, son dependientes de una continua estimulación antigénica. Si el número de células presentadoras de antígenos está limitado, y las células son de corta vida, entonces las células T CD8 no pueden dividirse el número de veces necesario para estimular los cambios fenotípicos y pueden residir en estados parcialmente diferenciados.

b) Alternativamente, puede ser que las células T CD8 están programadas desde su origen para proliferar y diferenciarse en células efectoras y de memoria cuando se encuentren con el antígeno. Este programa se inicia por la activación de las células T CD8 parentales, las cuales instruyen a las células hijas para dividirse y diferenciarse en las dos subpoblaciones celulares sin necesidad de la presencia de una fuerte estimulación antigénica. Este modelo predice que si el antígeno no es abundante (por ejemplo, durante ciertas infecciones), entonces las células T CD8, que devienen activadas, son aún capaces de diferenciarse en células de memoria²⁵.

En el caso de las células T CD4, su respuesta es más heterogénea y los mecanismos que ocasionan estas diferencias son desconocidos pero pueden estar relacionados con requerimientos diferenciales para citoquinas particulares. Por ejemplo, se ha demostrado que la diferenciación a células T CD4 de memoria, no requiere que las células vírgenes pasen por un estado efector intermedio, mientras que las células T CD8 vírgenes, transitan a través de un estado efector antes de la diferenciación a una célula T de memoria. La expansión de las células T durante una infección, resulta de un predominio de la proliferación con respecto a la muerte celular. En el pico de la fase de expansión, ambos procesos están balanceados y a partir de este momento, comienza a predominar la muerte celular. Las proteínas pro y anti-apoptóticas juegan un papel importante en estos cambios de la tasa de apoptosis. Por otra parte, las evidencias indican que la extensión de la expansión clonal primaria de las células T está correlacionada con el nivel de memoria generada, por lo que factores que participan en esta expansión estarían involucrados en la generación de las células de memoria²⁵. El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de esta regulación es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación celular ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas. Por el contrario una pérdida de la capacidad de proliferación celular es uno de los factores que originan el envejecimiento²⁵.

La cuantificación de la proliferación celular estimada por el incremento de la actividad mitocondrial, puede medirse por el método de la reducción del MTT, esta se realiza

mediante la medición de la absorbancia producida por la reducción enzimática del **Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)** por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y que da lugar a un producto coloreado de color púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La conversión solo se realiza en células vivas y se asume que permite un conteo simple, preciso y altamente reproducible de las células metabólicamente activas en las que la cantidad de formazán producido es proporcional al número de las mismas²⁶.

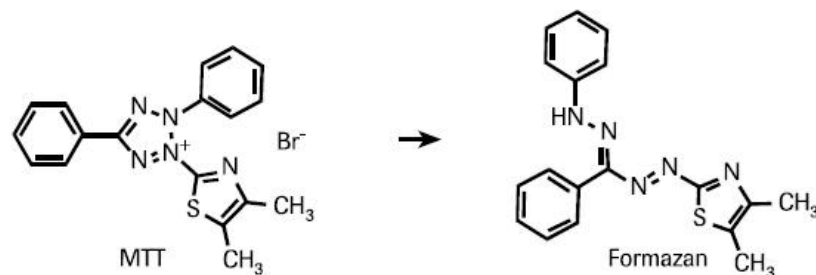


Fig. 16. Transformación enzimática del MTT a la sal de Formazán en células viables
Fuente: Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas .Laboratorio de Investigación en Inmunología.

3.2.2. Citoquinas.-

Las citoquinas son un amplio grupo de moléculas (proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia) de gran interés en Inmunología por su capacidad de regular la respuesta inmune como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos aunque también pueden poseer otras muchas funciones tales como las que efectúan durante la embriogénesis, entre otras. Aunque mayoritariamente están producidas por leucocitos, determinadas citoquinas pueden secretarse por otros tipos celulares. Han sido descritas distintas alteraciones de ellas en enfermedades como las autoinmunes o en inmunodeficiencias^{27,28}.

Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular que originariamente fueron designadas con el término linfocina al considerárseles como productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta a antígenos. En general, no se detecta una producción constitutiva de estas moléculas, siendo necesaria la activación celular para

que se produzcan citoquinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. La mayoría de las citoquinas son secretadas en forma glicosilada que incrementa su estabilidad y solubilidad. La producción de las citoquinas suele ser breve (transitoria), limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo (en general el agente extraño). En muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una corta vida media ²⁷. Las citoquinas son el principal medio de comunicación intercelular ante una invasión microbiana, además sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica ²⁸.

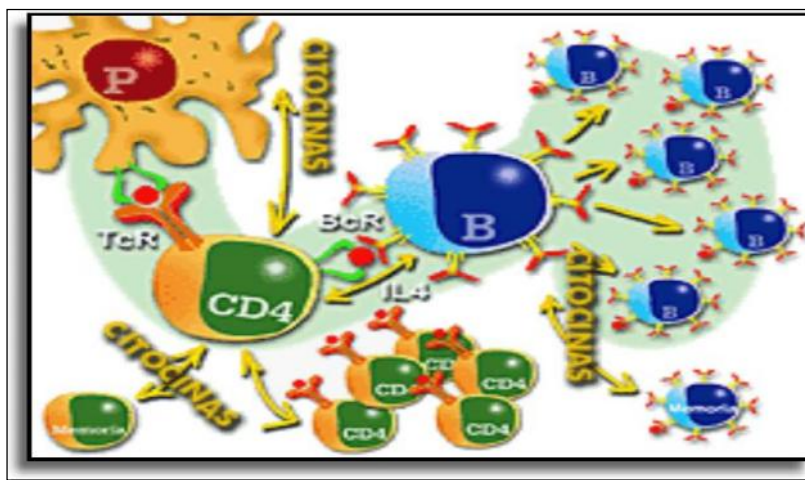


Fig. 17. Acción de las citoquinas sobre las células
Fuente: Universidad de Córdoba. Hospital Reina Sofía de Córdoba. España

3.2.2.1. Propiedades generales de las citoquinas.-

Las citoquinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas secretadas, de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa). Aunque existen muchos tipos de células productoras de citoquinas, dentro del sistema inmune natural, los macrófagos son las células más comprometidas en la síntesis de citoquinas, mientras que en el sistema inmune específico son las células T colaboradoras (Th) ya que sus citoquinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmune una vez activadas por el contacto con las correspondientes células presentadoras de antígeno (CPA). Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una

cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica. La afinidad de cada receptor hacia su citoquina correspondiente suele ser bastante alta, del orden de lo femtomolar (10^{-15} M) a lo picomolar (10^{-12} M) ²⁹.

Sus funciones son muy variadas, pero se pueden clasificar en unas pocas categorías:

- Diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario
- Comunicación entre células del sistema inmunitario (espacio estrecho entre célula y célula)
- En algunos casos, ejercen funciones efectoras directas ³⁰.

Las citoquinas ejercen un efecto **autócrino** cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto **parácrino**, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentran en su vecindad. En algunos casos pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma **endocrina** ²⁷.

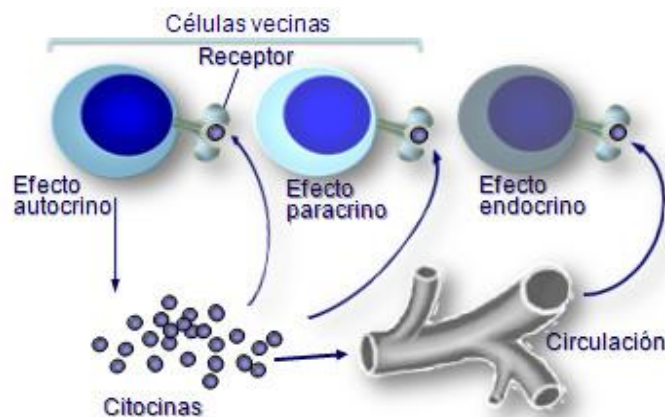


Fig. 18 Efectos citoquinas: Las citoquinas pueden ejercer su efecto de forma autocrina (misma célula), parácrina (células vecinas) y endocrina (células lejanas a través de la sangre). Las citoquinas son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, mediante la unión a receptores de alta afinidad.

Fuente: Universidad de Córdoba, Hospital Reyna Sofía de Córdoba. España

Algunas importantes características funcionales de las citoquinas son: su **pleiotropismo**, de tal manera que una misma citoquina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares. Para ejemplificar, la IL-4 estimula la diferenciación de linfocitos Th0 en Th2, a nivel de células plasmáticas, estimula la síntesis de IgE, e inhibe la activación de macrófagos mediada por IFN- γ , su **redundancia**, es decir, que varias citoquinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular. Una consecuencia de estas propiedades es que, en ausencia de una determinada citoquina, sus funciones pueden ser reemplazadas total o parcialmente por otras, por ejemplo, la IL-2, IL-4 e IL-5 estimulan la proliferación de los linfocitos B. El **sinergismo** es otra propiedad mediante la cual dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente, por ejemplo, la acción conjunta de IL-4 e IL-5 induce en células B el cambio de clase para que produzcan IgE, en cambio en el **antagonismo** se observa inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos, por ejemplo el IFN- γ bloquea el cambio de clase promovido por IL-4^{27,29}.

3.2.2.2. Principales tipos de respuesta mediadas por la acción de las citoquinas.-

- 1.** Activación de los mecanismos de inmunidad natural:
 - a. Activación de los macrófagos y otros fagocitos
 - b. Activación de las células NK
 - c. Activación de los eosinófilos
 - d. Inducción de las proteínas de fase aguda en el hígado.
- 2.** Intervención en la respuesta celular específica
 - a. Actúan colaborando en la activación y proliferación de células B hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.
- 3.** Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica
- 4.** Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea
- 5.** Inducción de la curación de las heridas²⁹.

3.2.2.3. Mecanismo de regulación de citoquinas.-

El distinto espectro de citoquinas secretadas por las dos subpoblaciones de linfocitos Th₁ y Th₂ determina los efectos biológicos diferenciales durante el curso de la respuesta inmune. Las dos poblaciones linfocitarias están sujetas a finos controles cruzados ²⁹.

Las células Th₁ producen IL-2, INF- γ y TNF- α , son los responsables de las funciones de inmunidad celular (activación de linfocitos T e hipersensibilidad de tipo retardado), destinadas a responder contra parásitos intracelulares (virus, protozoos y algunas bacterias).

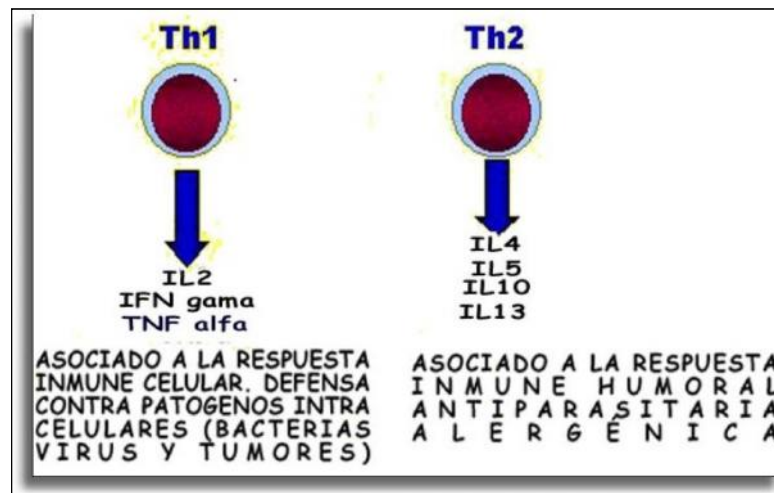


Fig. 19. Efectos biológicos de Th1 y Th2

Fuente: Universidad de Córdoba. Hospital Reina Sofía de Córdoba. España

Las células Th₂ producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Actúan como colaboradoras en la activación de las células B y son más apropiadas para responder a bacterias extracelulares (proteínas, toxinas) y a helmintos. También están implicadas en reacciones alérgicas ya que la IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa a los eosinófilos. Está cada vez más claro que el resultado de la respuesta inmune depende en buena medida de los niveles relativos de células Th₁ y Th₂. Un punto importante en todo esto es la existencia de una regulación cruzada entre Th₁ y Th₂:

- El INF- γ secretado por las Th₁ inhibe la proliferación de las Th₂

- Por su lado, la IL-10 secretada por las Th₂ inhibe la secreción de IL-2 e INF- por parte de las Th₁.

Además, las citoquinas secretadas por Th₂, inhiben la producción de óxido nítrico (NO) y otros bactericidas en los macrófagos, así como la secreción de IL-1, IL-6, IL-8 y otras citoquinas pro-inflamatorias²⁹.

Los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno también producen citoquinas como la IL-12 que regulan a su vez funciones inmunes efectoras. La IL-12 se produce en macrófagos activados en respuesta a infecciones bacterianas o de protozoos. Esta citoquina provoca la proliferación de células NK y Th₁, que aumentan la producción de INF- . Este interferón inmune ayuda en la mayor activación de macrófagos. De esta forma se cierra este circuito de retro regulación positiva entre macrófagos y Th₁, destinado a potenciar funciones efectoras de la rama celular de la inmunidad. Por otro lado, los macrófagos se ven inhibidos por IL-4 e IL-10 secretadas por los Th₂ (de nuevo una manifestación de la inhibición cruzada entre la rama especializada en la respuesta humoral y la centrada en la respuesta celular ante parásitos intracelulares)²⁹.

Se conocen en la actualidad no menos de 33 interleucinas las cuales difieren entre sí tanto desde el punto de vista químico como del biológico. Mientras algunas de ellas (IL-4, IL-10, IL-11) presentan esencialmente efectos favorables, otras (IL-1, IL-6, IL-8), paralelamente a su función defensiva, pueden también ser deletéreas para el organismo²⁸.

Interleucina – 1 (IL-1): producida por macrófagos y células epiteliales, induce la reacción de fase aguda, la activación y reconocimiento por parte de linfocitos T y macrófagos del lugar donde se desarrolla la respuesta inmunitaria. Actúa junto con el TNF- en la inmunidad innata y en la inflamación^{28, 29}.

Interleucina – 2 (IL-2): producida por linfocitos Th₁, estimula el crecimiento y la diferenciación de la respuesta de los linfocitos T. Estudios realizados en modelo murino sobre la respuesta inmune en Leishmaniasis, se vio que esta citoquina junto a TNF- e INF- inducen la producción de óxido nítrico en el macrófago lo que hace que estos ratones resuelvan sus lesiones de manera natural.

Interleucina – 4 (IL-4): relacionada con la proliferación de linfocitos B, mastocitos y linfocitos Th₂; es la citocina mejor caracterizada en la regulación de la respuesta inmune humoral; en pocas cantidades induce secreción de las subclases de Inmunoglobulina G: IgG1, IgG3 e IgG4; mientras que en excesiva cantidad induce la producción de IgE por lo que tiene un importante papel en las reacciones alérgicas. En la Leishmaniasis, esta citoquina, junto a otras, son secretadas tras la activación policlonal de células B en ratones susceptibles a esta enfermedad.

Interleucina – 5 (IL-5): producida por linfocitos Th₂ y mastocitos, estimula el crecimiento y proliferación de eosinófilos, es la citocina con rango de acción más reducido al inducir la generación de Inmunoglobulina A (IgA), junto a la IL-4 son secretadas en ratones susceptibles a la Leishmaniasis ²⁶.

Interleucina – 6 (IL-6): producida fundamentalmente por los fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos, induce a los hepatocitos a sintetizar varias proteínas plasmáticas en la respuesta de fase aguda, entre estas destacan: el fibrinógeno, la proteína amiloide, la ceruloplasmina, la proteína ligante de lipopolisacárido (LPS), la lactoferrina y algunos fragmentos del complemento (se ha observado que algunas proteínas del complemento incrementan la síntesis de IL-6), también estimula el crecimiento y diferenciación tanto de linfocitos T como linfocitos B, además, últimos estudios indican la presencia de IL-6 y TGF- en la estimulación de la respuesta de tipo Th₁₇. Adicionalmente, IL-6 es el factor autócrino de crecimiento de células tumorales B malignas y benignas (Mieloma múltiple, Mixoma cardiaco), también esta elevada en Lupus Eritematoso Sistémico (autoinmunidad). Esta citoquina junto a otras, se secretan en la Leishmaniasis en ratones susceptibles a esta enfermedad ^{28,31}.

Interleucina – 8 (IL-8): producida por monocitos, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, su función es atraer a neutrófilos y linfocitos vírgenes (factor quimiotáctico), así como movilizar, activar y provocar la degranulación de neutrófilos. También estimula la angiogénesis ²⁸.

Interleucina – 9 (IL-9): es una linfocina polipeptídica glicosilada, secretada por células T activadas por IL-2, tiene efectos *in vitro* promotores del crecimiento sobre las células

cebadas. También puede coestimular a las células T junto con IL-2 o IL-4 y puede estimular en potencia a progenitores hematopoyéticos. La presencia de IL-9 en el modelo *Leishmania*-ratón, nos indica susceptibilidad de éste a la enfermedad²⁸.

Interleucina – 10 (IL-10): llamada antes factor inhibidor de la síntesis de citoquina; es una proteína producida por células Th₂ células T CD8, monocitos, queratinocitos y células B activadas. Inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas, por lo tanto participa en el control de reacciones inmunitarias innatas e inmunidad celular y expresión de moléculas del MHC clase II ²⁸. Se conoce que la IL-10 es una de las citoquinas más importantes en modular la respuesta inmune en pacientes con infecciones crónicas incluyendo *Leishmaniasis*; principalmente por su capacidad de inhibir la síntesis de IFN- γ y por ende en la activación de los macrófagos. Estos estudios han demostrado que la IL-10 es capaz de inhibir la respuesta inmunológica de tipo Th₁ y Th₂ tanto en modelos experimentales como en enfermedades infecciosas en humanos. Previos estudios han evidenciado que la incapacidad de producir IFN- γ observada en los pacientes con *Leishmaniasis* visceral en su fase aguda y en los pacientes con *Leishmaniasis* cutánea en la fase inicial de la infección, puede ser restaurada al neutralizar la IL-10 mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra la misma ³².

Interleucina – 12 (IL-12): se llamó factor de maduración del linfocito citotóxico o factor estimulador de célula NK; sintetizado predominantemente por células B y macrófagos. Esta citoquina es producida por células fagocíticas en respuesta a bacterias, productos bacterianos y parásitos intracelulares representando un puente funcional entre la resistencia innata y la inmunidad adaptativa. La producción de la IL-12 y sus isoformas como la IL-12p40 por los macrófagos activados se suprime por la IL-4 y la IL-10. Promueve la proliferación de linfocitos T y células NK activados, aumentando en esta última célula la actividad lítica. Es un inductor potente de la producción de IFN- γ por las células T y NK en reposo o activadas. Induce selectivamente la diferenciación de linfocitos Th₀ en Th₁, pero suprime las funciones dependientes de Th₂ como la producción de IL-4, IL-10 y anticuerpos de tipo IgE. En *Leishmaniasis* experimental se ha observado que la depleción de IL-12 hace susceptible a los ratones a la enfermedad,

mientras que la administración sistémica de IL-12 tiene un efecto protector. En pacientes HIV positivos, IL-12 induce a linfocitos periféricos a producir IFN- γ y mejora la actividad citotóxica de las células NK^{28,31}.

3.2.3. Interferón.-

Los interferones fueron inicialmente descritos como agentes producidos por células infectadas por virus. Posteriormente se descubrió que además de su capacidad antiviral ejercían efectos reguladores sobre la proliferación y la diferenciación de varios tipos celulares y tenían capacidad de modular el sistema inmune²⁷. Según sus características y la similitud de sus secuencias de nucleótidos, los IFN se clasifican en tres grupos principales: IFN- α , IFN- β e IFN- γ . A éstos deben añadirse los IFN omega y tau, el interferón omega es segregado por los leucocitos en las infecciones virales y en los tumores y el interferón tau secretado durante el embarazo. Los IFN- α , β , **omega y tau** comparten similitudes estructurales y constituyen el tipo I (antiguamente denominado "tipo leucocitario y fibroblástico"), ya que se unen al mismo receptor (receptor de tipo I) El IFN- γ es estructuralmente distinto a los demás y constituye por sí solo el tipo II (tipo inmune), que se une al receptor de tipo II. Los IFN no actúan aisladamente, sino que influyen y son influidos por la mezcla de citoquinas y las demás situaciones celulares en las que intervienen. Cualquier efecto atribuido a un IFN o a cualquier otra citoquina puede ser diferente bajo condiciones distintas. Las acciones de los IFN se han estudiado principalmente *in vitro* y en modelos animales y para la mayor parte de ellas²⁹.

La síntesis de IFN puede ser inducida por ciertas citoquinas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores estimuladores de colonias (CSF-1), IL-1, IL-2 y el TNF. En ocasiones, incluso el IFN- γ puede inducir la producción de IFN- α . Virtualmente toda célula nucleada puede producir IFN- α o IFN- β . No obstante, los principales productores de IFN- α son los linfocitos B, las células NK y los macrófagos. Los principales productores de IFN- β son los fibroblastos, las células epiteliales y los macrófagos. Las únicas células productoras de IFN- γ son los linfocitos T, los macrófagos y las células NK. Las infecciones por bacterias (especialmente

aquellas que se replican dentro de las células), micoplasmas y protozoos pueden inducir la síntesis de IFN²⁹.

3.2.3.1. Interferón Gamma (INF-).-

Es una glicoproteína multifuncional que se caracteriza por sus propiedades antivirales, comparte muchas acciones con los interferones de tipo I. Produce efectos antiproliferativas, y antiprotozoaricas. Además posee acciones inmunomoduladoras: aumenta la expresión de las moléculas MHC – I y II, actúa sobre los linfocitos B, macrófagos y de manera autócrina sobre los linfocitos Th₁ favoreciendo su propia síntesis. Participa de la respuesta inflamatoria; posee un efecto activador sobre las células mononucleares, induce la síntesis de proteínas de la cadena respiratoria lo que le permite ejercer un efecto microbicida (estallido respiratorio), aumenta la producción de IL-1, IL-12, peróxido de hidrógeno y disminuye la expresión de IL-8. Es quimiotáctico para monocitos pero no para neutrófilos¹⁹. El IFN- es producido principalmente por las células T y células asesinas naturales activadas por antígenos, mitógenos o aloantígenos. Es producida por los linfocitos que expresan los marcadores de superficie CD4 y CD8. La síntesis de IFN- se induce, entre otras cosas, por la IL-2 y es inhibida por dexametasona y ciclosporina (ciclosporina A). Las células B también producen IFN- . Tiene actividad antiviral y antiparasitaria y también inhibe la proliferación de una serie de células, tiene sinergismo con TNF- y el TNF- en la inhibición de la proliferación de diversos tipos de células. Las actividades del IFN- relacionada con la inhibición del crecimiento son más pronunciadas que las de los demás interferones. Sin embargo, la actividad biológica principal de IFN- parece ser inmunomoduladora en contraste con los otros interferones que son principalmente antivirales. INF- es un modulador de las células T, funcionalmente en el crecimiento y diferenciación. Se trata de una promotora del factor de crecimiento de los linfocitos T y potencia la respuesta de estas células con mitógenos o factores de crecimiento. En Leishmaniasis experimental en modelo murino, esta citoquina junto a la IL-2 y TNF- , inducen la producción de óxido nítrico por los

macrófagos, dicho efecto induce en los ratones, la resolución de sus lesiones de manera natural^{33, 34, 35}.

3.2.4. Factor transformante de crecimiento (TGF- β 1).-

El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) es sintetizado por muchas estirpes celulares como linfocitos, macrófagos y células dendríticas, y su expresión regula de manera autócrina o parácrina la diferenciación, proliferación y el estado de activación de éstas y muchas otras células. El TGF- β 1 es una citoquina importante en la modulación de la respuesta inmune en leishmaniasis experimental. Por una parte se ha señalado que la producción de TGF- β 1 es inducida por el parásito y por tal hecho constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica del hospedador al suprimir a los linfocitos T CD4⁺ Th₁³⁶.

3.3. Determinación de la presencia de citoquinas.-

La determinación de la presencia de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares se puede realizar a través de ensayos inmuno-enzimáticos como el ELISA.

3.3.1. Análisis por enzimas fijadas a inmoadsorbentes (ELISA).-

El enzimoimmunoanálisis es el método más difundido para el diagnóstico de laboratorio utilizando anticuerpos y antígenos marcados con enzimas. El ELISA fue introducido por E. Engvall y P. Perlman al inicio de la década de los 70, tiene una sensibilidad y especificidad promedio del 99.5% y 99.8% respectivamente. Es una prueba objetiva y automatizable, está exento de legislación restrictiva y los reactivos usados se conservan durante un tiempo muy prolongado. Se puede trabajar con distintos fluidos corporales (suero, plasma, LCR) y además de sobrenadantes de cultivos celulares³⁷.

La técnica ELISA se basa en una reacción antígeno – anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida; la detección de un antígeno inmovilizado en la fase sólida mediante anticuerpos directa o indirectamente producen una reacción de color que se genera por la interacción de un agente cromogénico y una enzima acoplada al anticuerpo

detector. En ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y este a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada; el producto de la reacción que cataliza esta enzima puede ser medido por espectrofotometría. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que si no se ajustan correctamente puede afectar a los pasos sucesivos y al resultado de la prueba. Esta técnica consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre, además, se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA^{38, 39}. Antígenos y anticuerpos se pueden unir covalentemente al material particulado, tal como celulosa y poli(acrilamida), y que también se puede obtener una adsorción pasiva satisfactoria a tubos, perlas, discos o micro placas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno. En la actualidad se utilizan microplacas de 96 pocillos de plástico, dentro de éstos los de poliestireno gammairradiados y los de cloruro de polivinilo porque tienen mayor capacidad para formar enlaces estables que los de poliestireno no tratados, estos son los más utilizados ya que permiten aumentar su capacidad de adsorción (fenómeno de superficie) de moléculas y con fondo ópticamente claro para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos^{39, 40}.

Como ya se ha mencionado, una parte esencial del inmunoensayo por enzimas es la conjugación del anticuerpo o antígeno con la enzima. Es necesario que la enzima tenga actividad elevada, sea económica y obtenible en una forma pura y que posea una actividad catalítica de una reacción que permita la transformación del sustrato, o del co-sustrato a un producto fácilmente medible. Las enzimas consideradas hasta ahora más satisfactorias son la Peroxidasa de rábano picante (Horseradish peroxidase), la glucosa oxidasa, la α -galactosidasa y la fosfatasa alcalina. Estas son fijadas usualmente a anticuerpos o antígenos por medio de glutaraldehído o peryodato. Los conjugados obtenidos de esta manera han demostrado ser estables durante muchos meses, incluso

años ³². La elección del sustrato es crítica en el enzimo-inmunoanálisis, este debe ser estable y soluble antes y después de su transformación. Los agentes cromogénicos deben ser incoloros inicialmente y fuertemente coloreados tras la transformación. Para los conjugados de fosfatasa alcalina, es adecuado el p-nitrofenilfosfato generando un producto soluble de color amarillo; para los de Peroxidasa que reduce al sustrato peróxido de hidrogeno produciendo oxígeno el cual oxida a otros compuestos cromogénicos tales como: Tetrametilbenzidina (TMB), cuya oxidación genera un producto de color azul oscuro, la O - fenilendiamina (OPD), que es oxidado a un producto coloreado que varía del naranja al pardo oscuro y el Ácido azino-(3-etil)-benzo-sulfónico (ABTS), cuya oxidación genera un producto que va del verde al azul, estos cromógenos, han probado ser satisfactorios ⁴⁰.

3.3.1.1. Fases de un ensayo ELISA.-

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. ***Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos.*** La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados de poliestireno y de cloruro de polivinilo que tienen gran afinidad por proteínas. Así, el procedimiento de recubrimiento de los pocillos debe realizarse cuidadosamente. Si se usa poco antígeno y/o anticuerpo, se pueden obtener falsos positivos. Por el contrario, si se usa demasiado antígeno y/o anticuerpo, el exceso dará lugar a una reacción falsa negativa.
2. ***Formación de una o más capas de inmunocomplejos.*** En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo (anti-antígeno) marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario marcado anti anticuerpo primario (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se

ensayan diferentes relaciones de antígeno libre frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.

3. **Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima** (Peroxidasa, fosfatasa alcalina...). El anticuerpo es conjugado a la enzima en los ensayos directos, indirectos y sándwich. El antígeno es marcado con la enzima cuando se emplean en ensayos de competición de antígeno. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado periodo de tiempo hasta la producción de una solución coloreada gracias a la presencia del sustrato y cromógeno adecuado, esta solución coloreada producida por la transformación del sustrato puede ser valorada y cuantificada por medio de un espectrofotómetro. Si no transcurre el tiempo adecuado para que se dé la reacción, no se evidenciará ningún color, interpretándose este resultado como un falso negativo, disminuyendo la sensibilidad de la técnica.
4. **Revelado de la reacción enzimática.** Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría ³⁹.

3.3.1.2. Pasos generales de un ELISA.-



Fig. 21. 1. Tapizado del pocillo con el Ag o Ac.

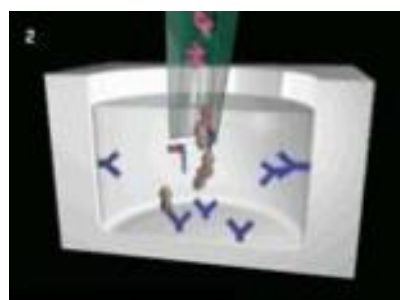


Fig 22. 2. Adición de la muestra problema con la mezcla de Ag o Ac.



Fig. 23. 3. Unión del Ag o Ac específico al Ag o Ac tapizado en el pocillo

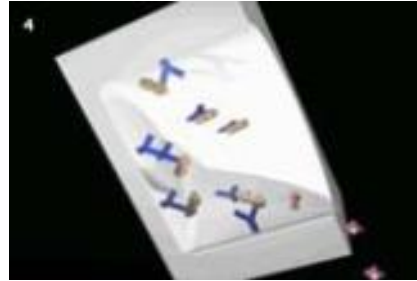


Fig. 24. 4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de Ag o Ac no unido

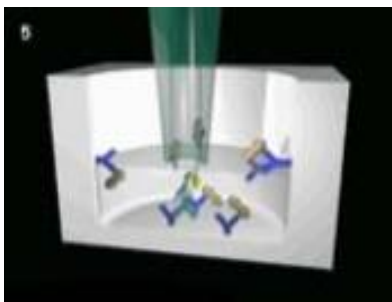


Fig. 25. 5. Adición del Ac secundario marcado con la enzima.



Fig. 26. 6. Unión del Ac secundario al Ag o Ac



Fig. 27. 7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida

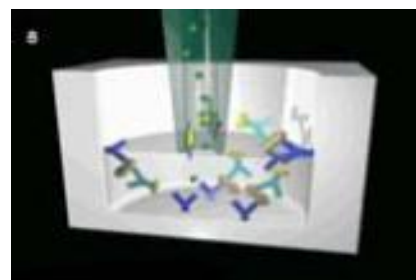


Fig. 28. 8. Adición del sustrato



Fig. 29 9. Unión del sustrato a la enzima

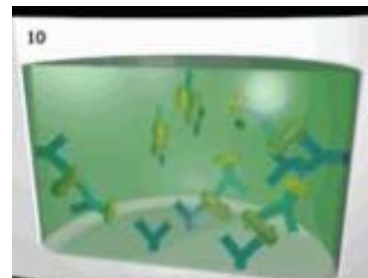


Fig. 30 10. Desarrollo del color ⁴¹
Fuente: www.cultek.com

3.3.1.3. SISTEMA DE AVIDINA – BIOTINA.-

La Avidina es una glicoproteína básica derivada de la albumina de huevo, tiene una enorme afinidad para la vitamina Biotina. La Biotina se puede unir con facilidad de manera covalente a un anticuerpo y después reaccionar con la Avidina acoplada a la enzima. Después de la reacción del antígeno con el anticuerpo no marcado, se añade el segundo anticuerpo marcado con Biotina. Ya que muchas moléculas de Biotina se pueden unir a un anticuerpo, la adición subsecuente de Avidina marcada con la enzima da lugar a un enlace firme generando un color intenso después de la transformación del sustrato. Entre las ventajas, son la carencia de unión inespecífica de la Avidina adicionada con la enzima con varios sustratos y el uso general de conjugados de Avidina para unirse a anticuerpos marcados con Biotina sin importar su especie de origen o su isotipo ⁴⁰.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales) o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo.

La determinación de Interferón Gamma (INF-) de ratón en sobrenadantes de cultivos celulares sigue el principio básico de un ELISA Sandwich que utiliza el sistema de Avidina – Biotina. El método tiene una sensibilidad analítica de 2pg/mL, esto quiere decir que la cantidad mínima de INF- de ratón detectado por el método es 2pg/mL ⁴².

III. ANTECEDENTES.-

La Leishmaniasis es una zoonosis parasitaria multifacética secundaria a la infección por un protozoo del género *Leishmania* que puede afectar a los seres humanos y otras especies de mamíferos. La Organización Mundial de la Salud la considera la cuarta enfermedad más importante en el trópico. Aunque se han realizado progresos en el diagnóstico y se han desarrollado una variedad de inmunoterapias y quimioterapias para el tratamiento de esta enfermedad, en los últimos años se ha observado un incremento de la incidencia de Leishmaniasis en América Latina. Al parecer, el contraste de los cuadros clínicos tiene origen en las diferencias de la respuesta inmunitaria en el hospedero ²³.

El traumatismo secundario a la picadura del vector induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que supone la migración de diferentes células, en especial macrófagos y linfocitos, hacia el sitio de la lesión con el fin de reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización. Por lo general, la infección por *Leishmania* induce una reacción inmunitaria muy compleja que varía de acuerdo con diferentes factores. Según sea la especie de *Leishmania* que interviene en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y su cronicidad, se observa un espectro de respuestas inmunitarias, desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica a través de células y anticuerpos. La respuesta de las células T se ha evidenciado a través de reacciones de hipersensibilidad tardía y **proliferación de linfocitos *in vitro* en presencia de antígenos de *Leishmania***. En términos generales, se ha identificado una intensa reacción mediada por células T para la forma LCL y ausencia de ella en la forma LCD, aunque ambos padecimientos desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la infección y se mantiene durante el curso del trastorno y desaparece sólo después de la eliminación de la mayoría de los parásitos ²³.

En esta enfermedad, la eliminación del parásito intracelular parece depender de la activación de la célula hospedera y se ha observado que la producción de citoquinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la curación, en tanto que las citoquinas

que desactivan al macrófago se correlacionan con la afección. Por esta razón, se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th₁ o Th₂ es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenicidad²³.

Se ha establecido también que la infección por *L. major* o *L. mexicana* en ratones resistentes conduce a la inducción preferencial de linfocitos tipo Th₁ que secretan IL2, INF- γ y TNF- α , las cuales activan a los macrófagos para la eliminación intracelular de los parásitos, vía síntesis de óxido nítrico. En contraste, la infección con esos mismos parásitos, en ratones susceptibles, conduce a la activación de linfocitos Th₂ productores de IL-4 e IL-10 que regulan en forma negativa la activación de macrófagos²³.

La regulación de la respuesta inmune dirigida contra el parásito de *Leishmania* es crítica para el establecimiento de un control efectivo contra la enfermedad. Para comprender mejor el posible papel que las subpoblaciones de células T, y sus citoquinas asociadas tienen en la progresión de la enfermedad y/o en la respuesta inmunitaria contra la infección por *L. braziliensis*, se realizó el estudio: “Correlaciones antígeno-específico de la respuesta inmune celular en la leishmaniasis humana que sugiere mecanismos de inmunorregulación” en el que se hace énfasis en la frecuencia de las células T activadas, células de memoria, y la producción de citoquinas por estas mismas células⁴³. Después de la determinación de la producción de citoquinas por las células T en respuesta al antígeno total de *Leishmania*, se realizó un análisis de correlación entre la producción de citoquinas para identificar los mecanismos celulares de inmunorregulación en la Leishmaniasis cutánea, en el que se demostró una correlación positiva entre la producción de las citoquinas IFN- γ o IL-10 por las células productoras CD45RO, una correlación negativa entre la frecuencia de IFN- γ producidas por las células CD69 y demostraron que IL-10 induce la regulación negativa de la actividad de los monocitos⁴³. Para analizar la activación selectiva de células Th₁ y Th₂, se desarrolló un sistema de ensayos primarios in vitro (PIV) específicos para *Leishmania major*. Mostraron que dentro de los primeros 7 días del PIV, células T inmaduras de los ratones resistentes CBA/CaH-T6J viraron hacia una respuesta de tipo Th₁, mientras las células T de los

ratones susceptibles Balb/c viraron hacia una respuesta de tipo Th₂. Algo similar ocurre en lo observado *in vivo* en los mismos ratones infectados con *L. major*. Desde el momento en que se dio la respuesta Th₁ o Th₂, se determinaron los niveles de producción de INF- γ , IL-1, 2, 4, 5, 10, y 12, TGF- β y óxido nítrico en los primeros 7 días de la respuesta de PIV para identificar factores que son críticos para el desarrollo de Th₁ o Th₂. El INF- γ , IL-10 y el óxido nítrico están relacionados con el desarrollo de Th₁; IL-1, IL-5, y el TGF- β están relacionados con el desarrollo del Th₂. Aunque concentraciones considerables de IL-12 fueron detectados, el IL-12 no está asociado con el desarrollo de Th₁ ni Th₂. La asociación de IL-10 con el desarrollo de Th₁ en el PIV fue inesperada. Sin embargo, esto también ocurrió *in vivo* en los ratones CBA que produjeron concentraciones sustanciales de IL-10 luego de la infección con *L. major*⁴⁴. La Leishmaniasis mucocutánea se caracteriza por una respuesta inmune celular exacerbada. Para comprender estos mecanismos se realizaron varios estudios, en uno de ellos se utilizó un sistema *in vitro* donde las células mononucleares periféricas de pacientes y donadores sanos se cultivaron en presencia de un antígeno total soluble de promastigotes de *L. braziliensis*; solo el 77% de células T de pacientes proliferó en respuesta a un estímulo policlonal en comparación con las células de donadores sanos. Esta incapacidad se reflejó también en la ausencia de proliferación de estas células luego de la incubación con el antígeno de Leishmania. Tanto las células de donadores sanos como las células de pacientes produjeron INF- γ luego de la estimulación policlonal e incubación con el antígeno de Leishmania, sin embargo, la producción de esta citoquina por células de pacientes fue significativamente superior luego del estímulo antigénico⁴⁵. Al evaluar la respuesta inmune *in vitro* de pacientes con Leishmaniasis mucocutánea en los que se analizó la proliferación celular utilizando un estimulante policlonal como la fitohemaglutinina, se vio una intensa respuesta de los pacientes y los controles (aparentemente sanos) los cuales muestran una respuesta similar a dicho estímulo⁴⁶. Por su parte, estudios realizados en modelo murino sobre el efecto leishmanicida de ciertas sustancias permitieron evaluar y caracterizar efectos sobre las células inmunitarias y la eficacia leishmanicida del Fucoïdan, un polisacárido polianiónico

sulfatado de algas cafés, en infecciones experimentales de ratones Balb/c con *L. donovani*. Para evaluar el tipo de respuesta inmunológica, se desarrolló una prueba PCR en tiempo real y un ELISA para varias citoquinas de Th₁ y Th₂ en ambas condiciones *in vivo* e *in vitro*. En adición a los efectos inhibitorios apreciables que se tienen en la multiplicación de amastigotes dentro de macrófagos, se logró la eliminación completa de la carga del parásito en bazo e hígado por el Fucoïdan. Este efecto curativo está asociado con el cambio de la diferenciación de células T de modo Th₂ a Th₁. Estos resultados sugieren la efectividad del Fucoïdan como un Inmunomodulador potente para el control de la leishmaniasis visceral en susceptibles y resistentes a antimoniales ⁴⁷.

En otro estudio en modelo murino, la paramomicina (PM) se formuló con fosfatidilcolina de estearilamina (SA) y liposomas (PC), en este se determinó el efecto leishmanicida *in vivo* e *in vitro* de la combinación de drogas para la terapia de dosis baja. La combinación PC-SA-PM mostró un efecto Inmunomodulador en células T CD4+ y CD8+ por la producción de INF- γ , y la disminución en la producción de IL-10 y TGF- β a niveles casi insignificantes ⁴⁸.

En referencia al tratamiento por productos naturales, la identificación del valor curativo de las plantas proviene generalmente de la información proporcionada por los propios originarios de los pueblos donde existen estos productos naturales, por lo que las investigaciones realizadas se basan en los conocimientos tradicionales e identificación de los principios activos para el desarrollo de nuevas drogas ⁴⁹.

En la década de los 80 se aislaron algunos compuestos de origen natural cuya actividad leishmanicida ha sido comprobada sobre algunas cepas de *Leishmania* entre los que podemos mencionar: Sinefugin, producido por los hongos *Streptomyces griseolus* y *Streptomyces incarnatus* que actúa como fuente inhibidora de la síntesis de DNA en promastigotes de *Leishmania donovani* ⁴; alcaloides triptamínicos como la hermaline (activo por vía oral), alcaloides de tipo bencil isoquinoleicos como la berberina, aislados de varias familias botánicas: Annonaceae, Menispermaceae, Bernerideceae, Rutaceae, Ranunculaceae; estos han sido aislados como compuestos antiprotozoarios,

encontrándose entre los más prometedores, por su eficacia, los alcaloides quinolinicos aislados de Evanta ⁴.

El Laboratorio de Farmacognosia - Parasitología del Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA) de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), desarrolló hace 20 años, investigaciones científicas de las cualidades curativas de la planta medicinal Evanta. La investigación se concentró en el programa de sustancias naturales antiparasitarias, enfocado principalmente en la leishmaniasis, la malaria y el mal de Chagas, siendo el estudio de las cualidades curativas de Evanta para la Leishmaniasis el más adelantado y en su fase final de validación científica y posterior registro ⁷.

Los chimanes y otros grupos étnicos emplean la corteza del tronco fresco de Evanta para sus curaciones. Originalmente, estos grupos étnicos, recolectaban el polvo de la corteza del árbol para convertirla en un emplasto y el que se aplicaban sobre la lesión, mínimamente por media hora. La realización de esta práctica y aplicación de Evanta, varias veces al día, cicatriza la lesión ⁷.

En 1987, un grupo de investigadores Franco-Boliviano demostró que los alcaloides de la corteza, raíces, tronco y hojas de Evanta (*Galipea longiflora Krause*), son los responsables de la actividad antiparasitaria. Entre 1989 y 1990 se identificaron 13 alcaloides activos y fueron caracterizados espectrofotométricamente como alcaloides quinolinicos. Algunos de estos alcaloides presentes en hojas resultaron eficaces y con baja toxicidad *in vivo*, por lo que fueron patentados con el nombre de Chimaninas A, B, C y D en homenaje a los Chimanes. Se demostró la mayor eficacia *in vivo* por vía oral, subcutánea e intralesional sobre *Leishmania amazonensis* de la chimanina B, al mismo tiempo se verificó que el extracto de la corteza del tronco suprime la carga parasitaria a concentraciones que varían entre 100 y 25 ug/mL. Últimos trabajos demuestran que las cortezas de raíz y tronco de Evanta provocan una supresión de la parasitemia en un 96 y 46 % respectivamente con un tratamiento de 4 a 6 semanas de duración. Evaluando el efecto de las quinolininas en ratones Balb/c infectados por *Leishmania donovani*, se vio que los alcaloides chimanina B y la 2-n-propilquinolina con aplicación diaria por 10 días

suprime la carga parasitaria en un 99.9% comparándose en efectividad con Glucantime. Esta planta ha sido estudiada en la medicina tradicional Chimane, Tacana y Mosekene, en la terapia contra Leishmaniasis ^{50, 51, 52, 53, 54}.

En 1993 en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) empezaron sus estudios en plantas de la Medicina Tradicional, con el financiamiento de FONAMA-EIA, se trabajó en la evaluación biológica de plantas medicinales contra las parasitosis de malaria (*Plasmodium falciparum*), Leishmania (*Leishmania spp*) y Chagas (*Trypanosoma cruzi*), como una herramienta en la validación de las farmacopeas tradicionales en proyectos multidisciplinarios.

En el IIFB, además de reproducir estudios químico-biodireccionados en modelos de Leishmania, *in vitro*, obtuvieron información tóxico- cinética, aguda y crónica, en ratones de la cepa Balb/c y ratas Wistar, usando extracto crudo y alcaloides totales puros obtenidos de la corteza del árbol de Evanta por el método de Extracción Continua y Maceración, también valoraron bajo métodos colorimétricos de manera cuantitativa la actividad Leishmanicida de Galipea Longiflora (Evanta) frente a una droga control (Anfotericina B) donde evidenciaron que existe una actividad leishmanicida del Extracto de Evanta frente a todas las cepas de Leishmania ensayadas ^{55, 56, 57, 58}.

Sobre la base de la información científica y medicinal acumulada hasta el momento sobre la especie Evanta (*Galipea longiflora*) se han realizado otros estudios en el IIFB realizando la optimización de la forma de extracción de alcaloides, determinándose además su actividad antiparasitaria *in vitro* de la corteza de la planta tradicionalmente empleada por la etnia Tacana con el objetivo de dar un aporte importante para el estudio de la búsqueda de fármacos menos tóxicos y naturales ⁹.

Los estudios iniciales sobre Evanta estaban referidos a evaluar su efecto leishmanicida, posteriormente, otros estudios se basaron en la evaluación del efecto de Evanta sobre la respuesta inmune generada en la Leishmaniasis. Estos estudios, realizados en el departamento de Inmunología del Instituto SELADIS dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (UMSA), sugieren que la Evanta podría actuar

como un Inmunomodulador de la respuesta del huésped al parásito. Se planteó que el extracto de alcaloides de Galipea Longiflora (Evanta) podría afectar tanto a la proliferación celular como a la producción de citoquinas pro – inflamatorias como son el TNF- e INF- *in vitro*, pero después de diversos análisis los resultados mostraron que esta planta afecta tanto a la proliferación celular como a la producción de INF- y cierta tendencia para TNF- (datos no significativos) con lo que queda excluida su acción sobre el TNF- ².

Un último estudio realizado en la Universidad de Estocolmo – Suecia sugiere que el extracto de alcaloides de Evanta puede ser considerado como una alternativa de tratamiento potencial para la Leishmaniasis. El extracto de alcaloides de Evanta puede controlar la reacción inflamatoria crónica debido al efecto sobre la proliferación celular y la producción de IFN- inducida por Con A y puede también controlar la carga del parásito debido a la actividad leishmanicida ⁸. En el mencionado estudio se planteó la hipótesis de que la curación observada al utilizar esta planta, no sólo se debía a la acción directa sobre el parásito, si no que posiblemente existía un efecto paralelo en la respuesta inmune del huésped en el proceso de curación, donde demostraron que Evanta tiene un efecto leishmanicida directo, así como interferencia en la activación tanto de células T murinas y células T humanas ya que observaron una reducción de la proliferación celular *in vitro* y la producción de INF- que podrían contribuir al control de la reacción inflamatoria crónica que caracteriza a la infección por Leishmania, lo cual sería un aspecto beneficioso para esta enfermedad por un lado porque Evanta actúa sobre el parásito y por otro lado porque actúa modulando la respuesta inflamatoria inmunopatogénica⁸.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

En Bolivia la importante migración de la zona andina a la zona tropical y la explotación predatoria de bosques tropicales son dos de las principales causas que están condicionando la aparición de nuevos focos de la enfermedad haciendo que cada vez tengan mayor expansión geográfica por lo que la Leishmaniasis se va convirtiendo en un problema de salud pública, tanto así que el área endémica llega a más del 70% del territorio boliviano. Esta expansión va a la par con el aumento del número de casos, pues para el año 1983 se reportaron 278 casos, para el año 2004 el número de casos notificados bordean los 2800 y para el 2006 se reporta 3152 casos sospechosos de Leishmaniasis en varios municipios de Bolivia ^{3,5}.

Sin embargo hasta el 2004 las medidas para controlar esta enfermedad eran escasas comenzando por el diagnóstico laboratorial y su tratamiento ya que, como se sabe, el Glucantime no es muy accesible para la población que comúnmente la padece debido a su elevado costo y disponibilidad y, si se accede a este, la toxicidad del mismo hace que muchas personas dejen de utilizarlo y buscan otras alternativas propias del lugar.

El uso de plantas medicinales se perfila como una estrategia terapéutica en la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas convirtiéndose en una excelente opción para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo la Leishmaniasis debido a su disponibilidad, bajo costo y muy baja toxicidad.

Muchas drogas utilizadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas han mostrado que no solo eliminan al patógeno sino que modifican la respuesta inmune; en este contexto, al estudiar el efecto de la Evanta en la leishmaniasis, además del efecto *in vitro* sobre el parásito (efecto leishmanicida), se estudió su acción sobre algunos efectores de la respuesta inmune generada en esta enfermedad, en la que mostraron un aparente efecto Inmunomodulador ^{2, 8}. El estudio *in vivo* que se reporta, permite apoyar la propuesta de un efecto Inmunomodulador de la Evanta.

V. JUSTIFICACION.-

El arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de la Leishmaniasis, así como de otras enfermedades tropicales es bastante precario. Como sabemos, en la actualidad, los medicamentos en uso son los antimoniales pentavalentes de primera generación (Pentostan y Glucantime) y los no-antimoniales de segunda generación (Pentamidina y Anfotericina B) ¹⁶. Estos fármacos presentan muchas contraindicaciones y elevada toxicidad por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos que disminuyan estos efectos y aumenten la eficacia respecto a la acción de estos sobre la Leishmaniasis.

La demanda por nuevos fármacos leishmanicidas se ha intensificado con el aumento de la resistencia a los antimoniales pentavalentes, así como a los fármacos de segunda generación. Sin embargo, el número de quimioterápicos disponibles principalmente para el tratamiento de enfermedades crónicas está muy por debajo de lo satisfactorio. En este contexto, varios compuestos han sido propuestos, sin embargo ninguno de ellos o los que están en uso, presentan eficacia y seguridad adecuadas ¹⁶.

La búsqueda de una terapia menos toxica y de fácil acceso para la Leishmaniasis respalda el estudio de las plantas medicinales y la Evanta (*Galipea longiflora Krause*) se perfila como una excelente opción no solo por su efecto leishmanicida demostrado en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* ^{4, 23, 41, 42, 43}, sino porque se ha mostrado también un efecto *in vitro* aparentemente inhibitor sobre algunos efectores de la respuesta inmune, que juegan un rol muy importante en la patogénesis de la enfermedad, actuando así como un Inmunomodulador ^{2, 8}.

Este estudio pretende aportar mucho más acerca del efecto del EAE sobre algunos efectores de la respuesta inmune (proliferación celular y producción de IFN-) generada en la leishmaniasis, pero esta vez *in vivo*, administrado vía endovenosa a animales de experimentación (ratones de la cepa Balb/c), y así ampliar el conocimiento sobre los efectos de esta planta.

VI. PREGUNTA DE INVESTIGACION.-

¿Cuál es el efecto *in vivo* del extracto total de alcaloides de Evanta sobre algunos efectores de la respuesta inmune (proliferación celular y producción de IFN-) obtenidos en el proceso de reactivación de linfocitos provenientes de ratones inmunizados con el antígeno de leishmania?

VII. OBJETIVOS.-

1. Objetivo general.-

- ✓ Evaluar la reactivación *in vitro* de linfocitos T provenientes de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* y tratados con el extracto total de alcaloides de Evanta (EAE)

2. Objetivos específicos.-

- ✓ Evaluar el efecto del EAE sobre la proliferación celular en el proceso de reactivación *in vitro* de linfocitos T provenientes de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis*.
- ✓ Evaluar el efecto del EAE sobre la producción de Interferón Gamma (IFN- γ), en el proceso de reactivación *in vitro* de linfocitos T provenientes de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis*.
- ✓ Comparar el efecto de Glucantime y el EAE sobre la proliferación celular y producción de IFN- γ en el proceso de reactivación *in vitro* de linfocitos T provenientes de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis*.

VIII. DISEÑO DE LA INVESTIGACION.-

1. Población en estudio:

Animales de Experimentación

2. Descripción:

Ratones hembras de la cepa Balb/c de aproximadamente 8 semanas de vida y un peso aproximado de 18 a 20g.

3. Tamaño de la muestra:

La población constó de 90 (noventa) ratones hembras de la cepa Balb/c.

4. Contexto y lugar:

El estudio se realizó en el laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS en el que se llevó a cabo los estudios *in vitro*, y en el Bioterio donde se realizaron los estudios *in vivo*, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA.

IX. DISEÑO DE ESTUDIO.-

1. Tipo de Diseño.

Diseño Experimental en el que se evaluó la reactivación de linfocitos T utilizando 6 grupos de ratones hembras de la cepa Balb/c:

- Grupo N° 1: Ratones hembras de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis*
- Grupo N° 2: Ratones hembras de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* y tratados con el EAE, a una dosis de 0,25mg/mL
- Grupo N° 3: Ratones hembras de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* y tratados con el EAE, a una dosis de 0,125mg/mL
- Grupo N° 4: Ratones hembras de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* y tratados con Glucantime (tratamiento convencional) a una dosis de 50uL/mL
- Grupo N° 5: Ratones hembras de la cepa Balb/c tratados con el EAE, a una dosis de 0,25mg/mL
- Grupo N° 6: Grupo control (Ratones sanos de la cepa Balb/c sin inmunización ni tratamiento)

El proceso se realizó en tres Etapas:

1. Inmunización de ratones hembras de la cepa Balb/c con el antígeno total de *Leishmania braziliensis* vía intraperitoneal
2. Tratamiento *in vivo* con el EAE vía endovenosa
3. Proceso de reactivación *ex vivo* donde se estimuló a los linfocitos T de los diferentes grupos de ratones utilizando Concanavalina A (Con A) y el antígeno total de *leishmania braziliensis*.

X. MATERIALES Y METODOS.-

1.- Materiales.-

1.1. Reactivos.-

a) Cultivo de Leishmania.-

- Medio 199 (Gibco)
- Suplementos para Medio 199:
 - ✓ Adenina (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Biotina (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Hemina (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Biopterina (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Trietanolamina (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Suero fetal bobino (Gibco)
 - ✓ Pest (Penicilina-Estreptomicina) (Gibco)
 - ✓ Glutamina (Sigma - Aldrich).

b) Obtención del antígeno de Leishmania.-

- Kit comercial para la cuantificación de proteínas por el método: Pirogalol (TECO-Diagnostics)

c) Inmunización y tratamiento *in vivo* de Ratones Balb/c.-

- Alcohol al 70%
- Antígeno total de *Leishmania braziliensis* (0,5mg/mL)
- Extracto total de alcaloides de Evanta (EAE) obtenido por el método de extracción acuosa y maceración provisto por el IIFB
- Glucantime (1,5g/5mL) (Aventis)
- Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma - Aldrich)

d) Cultivo celular.-

- Medio RPMI con rojo fenol (Gibco) (Ver anexo N°1)
- Suplementos para medio RPMI:
 - ✓ Hepes (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Bicarbonato de sodio (Sigma - Aldrich)
 - ✓ Suero fetal bobino (Gibco)
- Concanavalina A (Con A) (Sigma - Aldrich)
- Antígeno total de *Leishmania braziliensis* (50 ug/mL)
- Azul Tripán 0.2% (Sigma - Aldrich)
- Solución PBS 0,15 M, pH: 7,4 (ver anexo N° 2)

e) Evaluación de la Proliferación celular.-

- Kit de MTT (Invitrogen)
- Medio RPMI sin rojo fenol (Gibco)
- Solución Acido Clorhídrico (HCl – 0,01M) (ver anexo N° 3)

f) Determinación de Interferón Gamma de Ratón.-

- Kit de Interferón Gamma de ratón (MABTECH, Stockholm, Sweden)
- Albumina sérica bobina (BSA) (Sigma - Aldrich)
- Solución PBS 0,1 M, pH: 7,4
- Tween – 20 (Sigma - Aldrich)
- Enzima: Peroxidasa de Rábano Picante (R&D)
- Cromógeno/Sustrato: Tetrametil bencidina (TMB)/Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂) (R&D)
- Solución de parada: Acido Clorhídrico (HCl – 0,1M)

1.2. Equipos.-

- Campana de flujo laminar (Nuair Class II).
- Estufa de Incubación a 25° C (Lw Scientific, Inc)

- Estufa de incubación a 37° C (Lw Scientific, Inc)
- Estufa de incubación a 37° C y 5% de CO₂ (Nuair Class).
- Microscopio Óptico (Olympus)
- Microscopio Invertido (Olympus)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Sonicador (Sonic & Materials Inc. Danbury, Connecticut USA)
- Lector de ELISA (Awareness Technology Inc)

1.3. Otros materiales.-

- Cámara de Neubauer
- Estuche de disección
- Placas de Cultivo de 96 pozos (Becton Dickinson).

2.- Métodos.-

2.1. Cultivo de Promastigotes de *Leishmania braziliensis*.-

Promastigotes de *Leishmania braziliensis* (WHO 2305) proporcionado por el IBBA, fueron cultivados a 25°C por 3 a 4 días en Medio-199 conteniendo 10% de Suero Fetal Bobino, 50ug/ml de Penicilina/ estreptomycin y suplementado con Adenina (10 nM), Hemina (0.25%), biotina (0.1%) y biopterina (0.25 mg/ml).



Fig. 31. Promastigotes de *Leishmania braziliensis* en cultivo
Fuente: Laboratorio de Inmunología-SELADIS

Una vez que el cultivo alcanzó el pico máximo de la fase logarítmica de crecimiento antes de ingresar a su fase estacionaria, se realizaron repiques en el medio 199.

La viabilidad de los parásitos se examinó a través de un microscopio de fase invertida. De igual forma se observó las clásicas rosetas o acúmulos que presenta esta forma parasitaria al entrar a una etapa de su cinética de crecimiento (fase estacionaria). De manera previa se observó los parásitos al microscopio invertido para verificar posibles contaminaciones y la morfología adecuada de los mismos.



Fig. 32. Microscopio invertido para observar la viabilidad de *Leishmania braziliensis*
Fuente: Laboratorio de Histocompatibilidad-SELADIS

2.2. Obtención del antígeno total de *Leishmania braziliensis*.

Los Promastigotes de *Leishmania braziliensis* fueron utilizados en la fase logarítmica de crecimiento, en ese momento se procedió a la obtención del antígeno total por el método de Congelación - descongelación y Sonicación el cual se describe brevemente:

Los parásitos se colocaron en un tubo colector para someterlos a centrifugación por 10min a 1500rpm. El pellet obtenido (parásitos) se resuspendió en PBS 0,15 M, pH: 7.4 y se llevó a congelación a -20°C, el pellet congelado se descongeló rápidamente y se sometió a Sonicación sobre hielo a 20-50 kHz por 30min, el mismo que se llevó nuevamente a 9 ciclos más de congelación y descongelación. Del pellet obtenido se procedió a la cuantificación de proteínas utilizando un Kit comercial por el método de pirogalol siguiendo las instrucciones del fabricante. (Ver anexo N° 4). El método de Pirogalol se basa en la reacción de proteínas de la muestra que reaccionan en medio

ácido con rojo pirogalol y aniones molibdato dando un compuesto coloreado con pico de absorción a 600nm. El color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.



Fig. 33. Obtención de Antígeno de Leishmania por Sonicación y Congelación/Descongelación. Fuente: Laboratorio de Inmunología-SELADIS

2.3. Inmunización y tratamiento *in vivo* de Ratones Balb/c.-

a) Primera etapa - Proceso de inmunización *in vivo*.-

En esta etapa se inmunizaron los 4 primeros grupos de los 6 que se incluyeron en el estudio utilizando una concentración de 0,5mg de antígeno/mL (50ug/animal), la inmunización se realizó por 3 veces cada 15 días vía intraperitoneal.



Fig. 34. Inmunización *in vivo* vía intraperitoneal de ratones de la cepa Balb/c de los diferentes grupos de estudio.

b) Segunda etapa - Tratamiento *in vivo*.-

En esta etapa se incluyeron los grupos 2, 3 y 5, el tratamiento que se utilizó fue EAE inoculado vía endovenosa a una concentración de 0,25mg/mL en los grupos 2 y 5; 0,125mg/mL en el grupo 3; y Glucantime se utilizó en el grupo 4 a una concentración de 50ul/mL, el tratamiento se inició a partir de la segunda inmunización.



Fig. 35. Tratamiento *in vivo* vía endovenosa de ratones de la cepa Balb/c de los diferentes grupos de estudio.

La inmunización y tratamiento siguió el siguiente protocolo:

Todos los ratones de los diferentes grupos se inmunizaron al mismo tiempo por 3 veces, el tratamiento se realizó de la siguiente manera:

En los grupos 2, 3 y 4, se inició el tratamiento después de una semana de la segunda inmunización, todos los días culminando con éste a los 7 días de la última inmunización; en el grupo 5 (sin inmunización) se inicio el tratamiento junto a estos grupos.

c) Tercera etapa - Reactivación *ex vivo* de linfocitos.-

En esta etapa se procedió a la reactivación *in vitro* de linfocitos T provenientes del bazo de ratones hembras de la cepa Balb/c de los diferentes grupos de estudio evaluando algunos efectores de la respuesta inmune como la proliferación celular y la producción de IFN- .

2.4. Cultivo celular.-

Las células de bazo (linfocitos) fueron obtenidas a partir de ratones hembras de la cepa Balb/c de los diferentes grupos de estudio, las cuales fueron sacrificadas y los bazos removidos de manera aséptica obteniendo los linfocitos en medio RPMI por aplastamiento del bazo utilizando pinzas estériles.



Fig. 36. Células de Bazo de ratones hembras de la cepa Balb/c de los seis grupos de estudio.

El recuento celular se realizó en cámara de NEUBAUER. La viabilidad de las células utilizadas en los diferentes experimentos determinada por el ensayo de exclusión de colorante Azul Tripán fue mayor al 95%. (Ver anexo N° 5). Posteriormente se realizó el ajuste celular a una concentración de $2,5 \times 10^6$ cel/mL.

El ensayo de exclusión de colorante Azul Tripán permite diferenciar células vivas de células muertas. En las células viables, el Azul Tripán no es absorbido debido a su membrana celular intacta; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas por lo que al microscopio se muestran de un distintivo color azul.

2.4.1. Ensayo de proliferación celular.-

Las células obtenidas del bazo fueron adicionadas a placas de cultivo de 96 pozos a una concentración de $2,5 \times 10^6$ cel/mL, en medio RPMI suplementado. La Con A, una lectina

estimulante de la proliferación celular, fue utilizada a una concentración final de 5ug/mL y el antígeno de Leishmania utilizado a una concentración final de 50ug/mL, todos los tubos preparados fueron adicionados a las placas por triplicado.

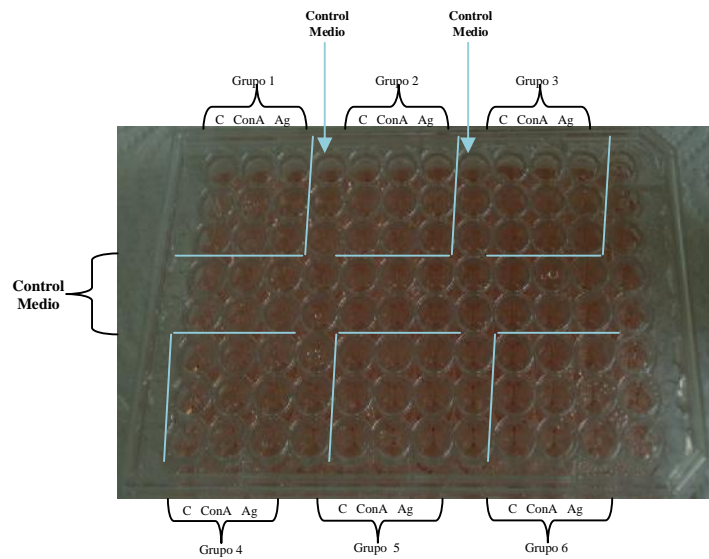


Fig. 37. Protocolo general del ensayo

Las células fueron incubadas por 48 hrs. a 37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad.

Los sobrenadantes fueron colectados después de las 48 horas de incubación y analizados en cuanto a la producción de IFN- .

La proliferación celular fue evaluada por el método de MTT en las células obtenidas del cultivo utilizando un Kit comercial (MTT cell proliferation assay), el ensayo fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver anexo N° 6). Para la lectura de la placa de cultivo se utilizó un lector de ELISA a 545nm con filtro diferencial de 630nm.

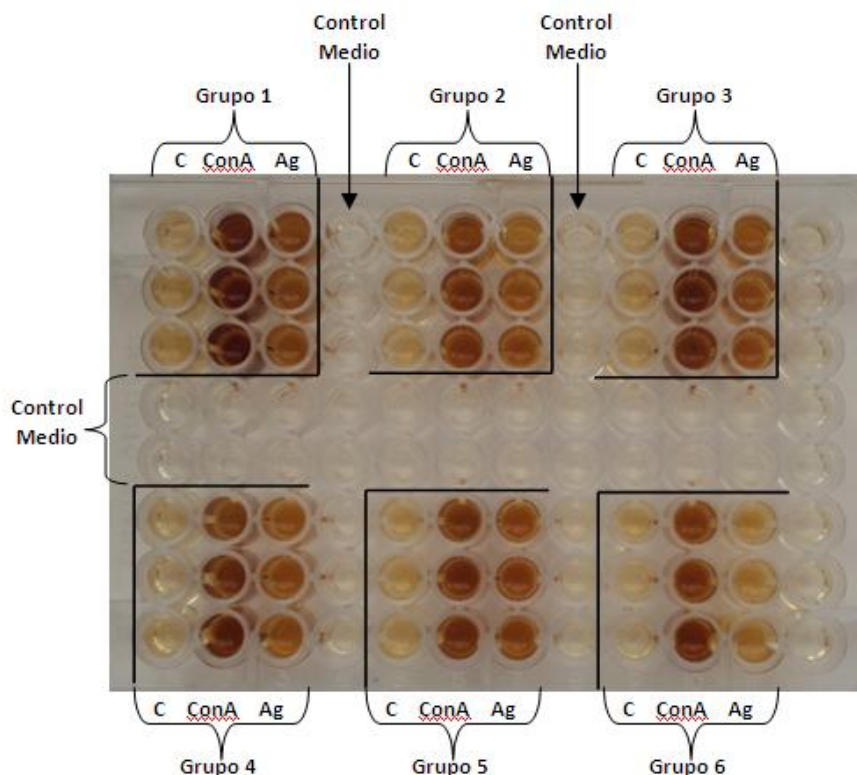


Figura 38. Células de Bazo después de la incubación y del ensayo de MTT

2.4.2. Detección de Interferón gamma (INF- γ).

Los sobrenadantes obtenidos del cultivo celular fueron analizados para medir la cantidad de INF- γ utilizando un kit comercial de ELISA tipo Sandwich de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver anexo N° 7). Para la lectura de las placas se utilizó un Lector de ELISA a 450nm de longitud de onda con un filtro diferencial de 630nm, el valor límite de detección del Kit es 2pg/mL los valores obtenidos se interpolaron en una curva realizada con el estándar provisto por el kit (Ver anexo N° 8).

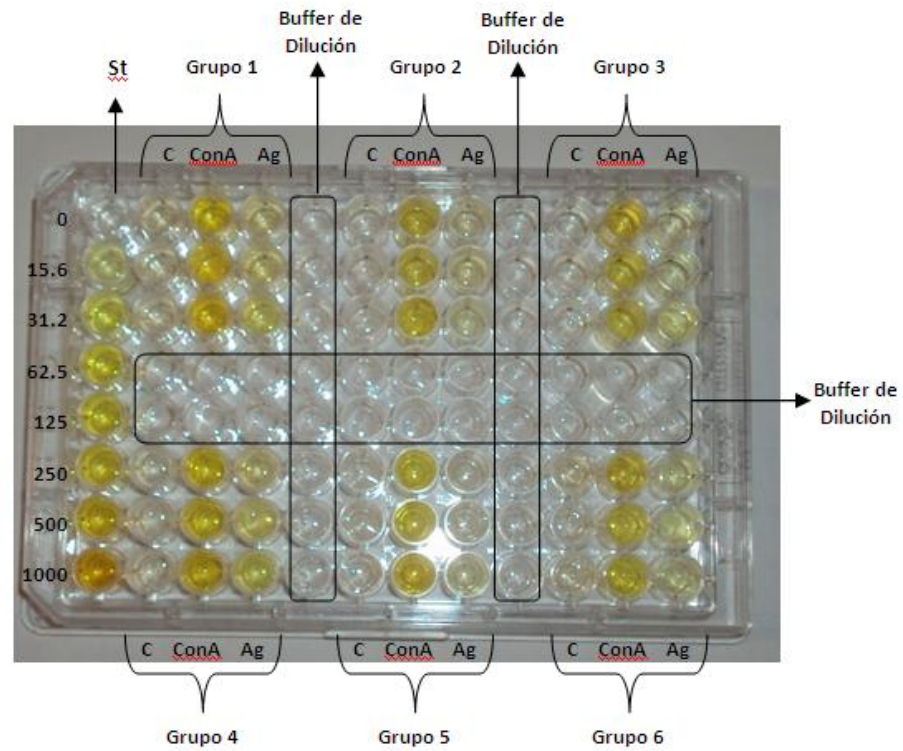
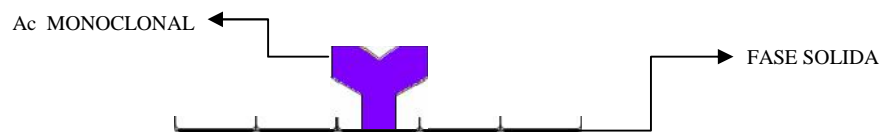


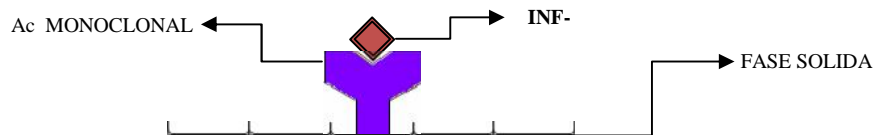
Fig. 39. Determinación de INF- por el método ELISA en los seis grupos de la población de estudio

El ELISA para INF- se basa en un ELISA tipo sándwich:

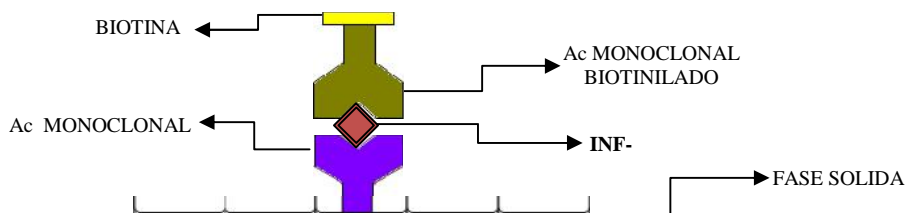
1º ETAPA: UNION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL A LA FASE SOLIDA.



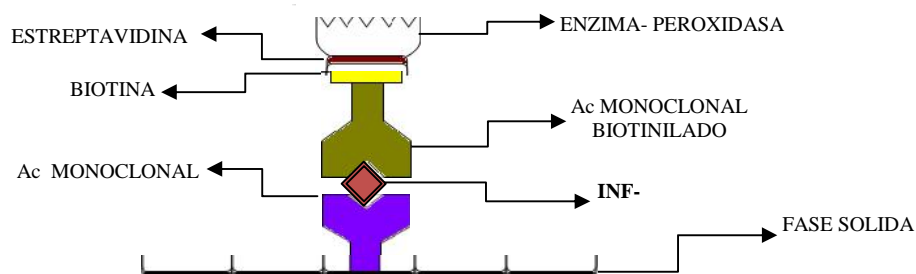
- ADICION DE LA MUESTRA CON INF-



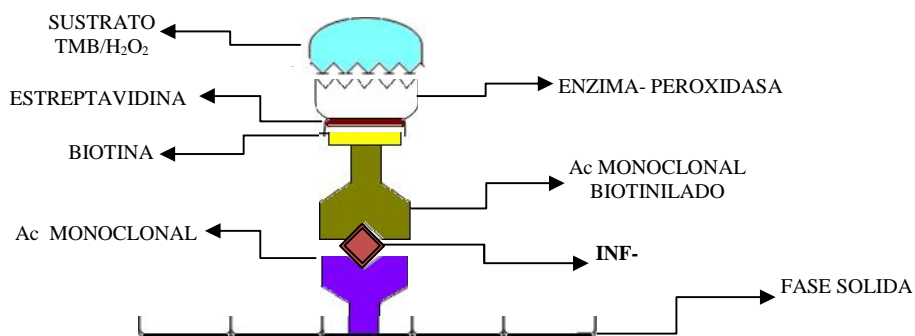
- ADICION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL BIOTINILADO (ANTI-INTERFERON GAMMA)



- ADICION DE ENZIMA PEROXIDASA + ESTREPTAVIDINA



- ADICION DE CROMOGENO/SUSTRATO (TMB/H₂O₂)



GENERA COLOR POR DEGRADACIÓN DEL SUSTRATO

XI. RESULTADOS.-

El cultivo de promastigotes alcanzó montos suficientes del parásito en su fase estacionaria. Esta pudo identificarse por observación microscópica con tinción Giemsa mediante la presencia de “rosetas de promastigotes”, agrupaciones típicas de esta fase de cultivo.

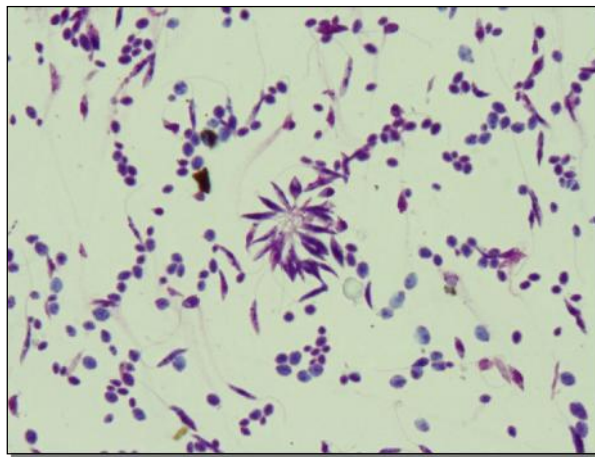


Fig. 40. Leishmania braziliensis. Promastigotes formando las típicas rosetas. Tinción Giemsa (Aumento 100X)

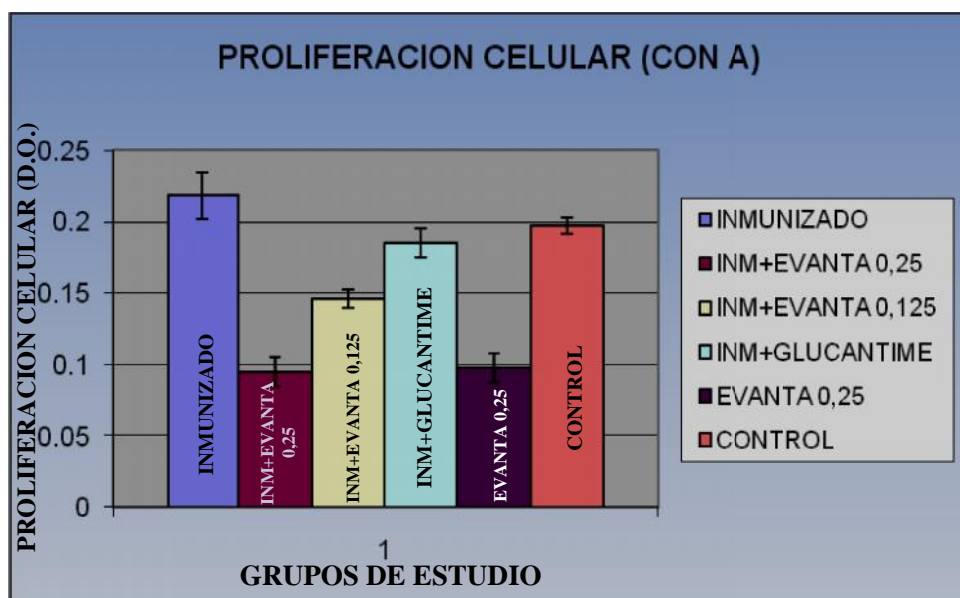
La obtención del antígeno tuvo una eficiencia similar a la reportada por otros autores (2,35mg/mL) de una concentración de 1×10^6 parásitos/mL

En la primera etapa del estudio, la inmunización de la población se realizó con el antígeno total (extracto crudo) de *Leishmania braziliensis* a una concentración de proteínas de 0,5mg/mL.

En la fase de reactivación de linfocitos provenientes de ratones hembras de la cepa Balb/c de los diferentes grupos de estudio, la proliferación celular fue evaluada en presencia del EAE administrado *in vivo* por vía endovenosa y a diferentes dosis (0,25 y 0,125mg/mL) utilizando el ensayo de MTT. La Con A y el antígeno de leishmania se utilizaron como estimulantes de la respuesta proliferativa.

Es importante hacer notar que el **Grupo N°1 (Inmunizado)** de la población de estudio fue utilizado como control de la proliferación celular sobre el cual se realizaron todos los análisis. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1. Efecto del EAE sobre la proliferación celular inducida por Con A en los diferentes grupos de estudio.-



Gráfica N° 1. Proliferación celular inducida por Con A en los diferentes grupos de la población de estudio

Para determinar el efecto del EAE sobre la proliferación celular inducida por Con A, los diferentes grupos de estudio (los que corresponden), fueron inmunizados y tratados *in vivo* con EAE y Glucantime, para luego, las células de todos los grupos ser estimuladas *in vitro* con Con A por 48Hrs. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Gráfica N° 1 donde podemos observar la proliferación celular respecto a los diferentes grupos de estudio (variables). Comparando cada uno de ellos respecto al **Grupo inmunizado** ($x = 0,218; \pm DS = 0,0164$) que es utilizado como control, hallamos que:

a) El **grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL** es estadísticamente diferente del control ($p = 0,005$) con un x y $\pm DS$ de 0,095 y 0,0102 respectivamente, estos resultados muestran inhibición de la proliferación celular.

b) Respecto al **grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,125mg/mL**, también se observa una diferencia significativa ($p=0,04$; $x =0,146$; $\pm DS=0,0069$) dichos resultados muestran una menor inhibición de la proliferación celular respecto del anterior grupo que puede estar relacionada con la concentración del EAE utilizado en el tratamiento.

c) Los resultados del **grupo inmunizado y tratado con Glucantime** muestran que no existe una diferencia significativa ($p = 0,09$; $x = 0,185$; $\pm DS = 0,0101$) comparando con el control. Este grupo fue incluido en el estudio con el objeto de evaluar el efecto del Glucantime sobre la proliferación celular y los resultados no muestran ningún efecto sobre éste.

d) El **grupo tratado con EAE a 0,25mg/mL** se incluyó en el estudio para verificar el efecto del EAE *in vivo*, en este grupo se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,003$; $x = 0,0973$; $\pm DS = 0,0101$) respecto al control, al comparar los datos de éste, con el grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL, se pudo observar que la inhibición de la proliferación celular en ambos grupos es similar, debido a la concentración del EAE, es decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos ($p = 0,09$).

e) El **Grupo sin inmunización ni tratamiento** se incluyó en el estudio como un control interno de todo el sistema, para verificar, por un lado si la proliferación celular fue inducida por Con A y por el otro si la inhibición de la proliferación fue inducida por el EAE y no por otros ajenos al estudio, verificando además la viabilidad de las células, los resultados de este grupo no muestran una diferencia significativa ($p = 0,07$; $x = 0,197$; $\pm DS = 0,0059$) comparado con el control debido a que la respuesta de las células de ambos grupos a un activador policlonal como la Con A es similar.

Comparando los resultados obtenidos con Glucantime y el EAE, se observa que Glucantime no tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta proliferativa, existiendo una diferencia significativa entre este y el grupo inmunizado y tratado con EAE a

0,25mg/mL ($p = 0,03$), en cambio la diferencia entre este y el grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,125mg/mL no es estadísticamente significativa ($p = 0,08$). La diferencia con ambos grupos se debe a la concentración del EAE utilizado en el tratamiento *in vivo*.

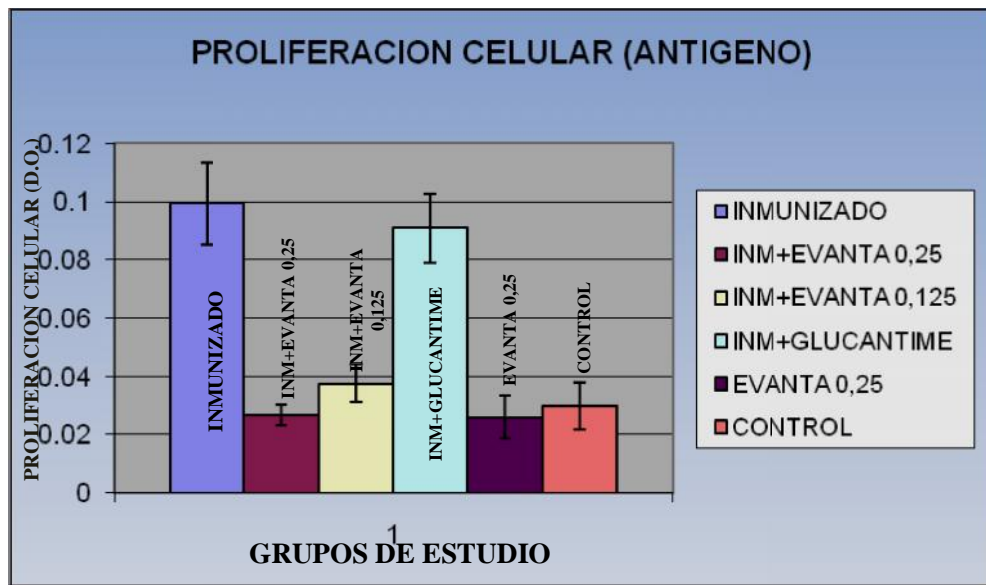
TABLA N° 1
PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR
INDUCIDA POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION
DE ESTUDIO

GRUPOS DE ESTUDIO	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inmunizado + Evanta 0,25mg/mL	56,43%
Inmunizado+ Evanta 0,125mg/mL	33,03%
Inmunizado + Glucantime	15,14%

En la tabla N° 1 se muestra el porcentaje de inhibición producida por el EAE y Glucantime sobre la proliferación celular inducida por Con A en los grupos correspondientes. Estos resultados reflejan que el EAE a una concentración de **0,25 mg/mL** inhibió la proliferación celular en un 56,43% mientras que a una concentración de **0,125 mg/mL** el porcentaje de inhibición fue del 33,03%.

El porcentaje de inhibición producido por **Glucantime** es de 15,14%, estos resultados nos muestran que el Glucantime, no afecta la proliferación celular inducida por Con A.

2. Efecto del EAE sobre la proliferación celular inducida por el Antígeno de Leishmania en los diferentes grupos de estudio.-



Gráfica N° 2. Proliferación celular inducida por el antígeno de leishmania en los diferentes grupos de la población de estudio

Para determinar el efecto del EAE sobre la proliferación celular inducida por el **antígeno de leishmania**, se procedió como en el caso anterior analizando los diferentes grupos de estudio.

Respecto al **Grupo inmunizado** que se utilizó también como control ($x = 0,0994$; $\pm DS = 0,014$), se observó que las células de este grupo respondieron al estímulo generado por el antígeno de Leishmania porque éstas ya fueron inmunizadas *in vivo* con el mismo antígeno por lo que la respuesta se debe a la memoria inmunológica.

Los resultados obtenidos se observan en la Gráfica N° 2, donde:

a) El Grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL muestra una diferencia significativa ($p = 0,007$; $x = 0,0267$; $\pm DS = 0,0034$) comparado con el control en el que se observa inhibición de la proliferación celular.

b) El **Grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,125mg/mL** nos muestra también una diferencia significativa ($p = 0,01$; $x = 0,0376$; $\pm DS = 0,0066$) comparado con el control, donde se observó una menor inhibición respecto al grupo anterior debido a la concentración del EAE utilizado en el tratamiento *in vivo*.

c) El **Grupo inmunizado y tratado con Glucantime** no es estadísticamente diferente ($p = 0,5$; $x = 0,0908$; $\pm DS = 0,012$) del control, estos resultados muestran que Glucantime no tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación celular.

d) El **grupo tratado con EAE a 0,25mg/mL**, muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,002$; $x = 0,026$; $\pm DS = 0,0073$) comparado con el control, este grupo como en el caso anterior, se incluyó en el estudio para ver el efecto del EAE *in vivo*.

e) El **grupo sin inmunización ni tratamiento** muestra una proliferación mínima (no hay inhibición) debido al estimulante de la proliferación celular ya que como no presentan memoria inmunológica, la proliferación observada se debe a una respuesta natural de células viables, este grupo es estadísticamente diferente ($p = 0,001$; $x = 0,030$; $\pm DS = 0,008$) del control.

TABLA N° 2
PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR
INDUCIDA POR EL ANTIGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES
GRUPOS DE LA POBLACION DE ESTUDIO

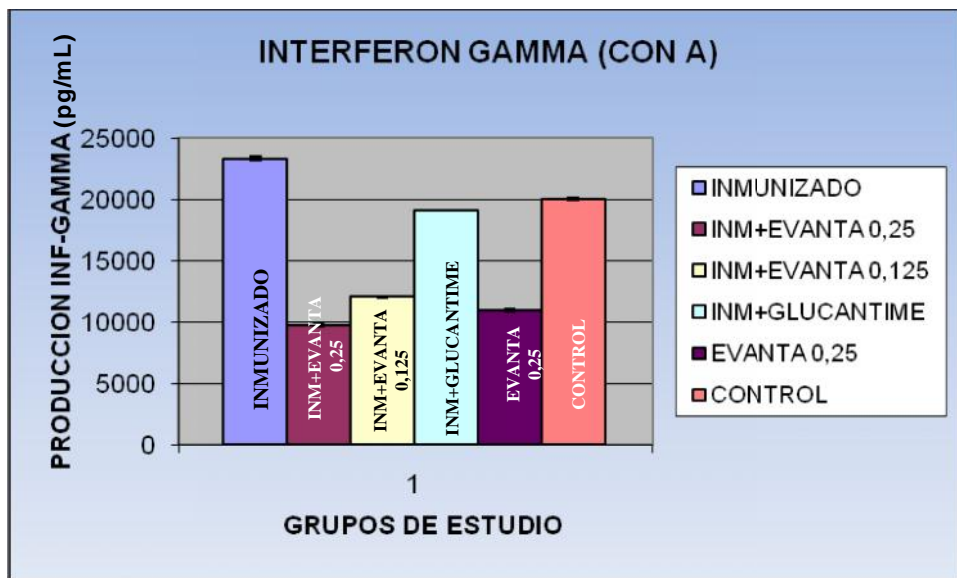
GRUPOS DE ESTUDIO	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inmunizado + Evanta 0,25mg/mL	73,14%
Inmunizado+ Evanta 0,125mg/mL	62,18%
Inmunizado + Glucantime	8,66%

En la tabla N° 2 se muestra el porcentaje de inhibición producida por el EAE y Glucantime sobre la proliferación celular inducida por el antígeno de leishmania en los grupos correspondientes comparados con el control. Estos resultados muestran que el

EAE utilizado en el tratamiento *in vivo* inhibió la proliferación celular (73,14%) a una concentración de **0,25mg/mL** en la que se observa una mayor inhibición respecto de la concentración de **0,125mg/mL** (62,18%).

En el **grupo inmunizado y tratado con Glucantime**, el porcentaje de inhibición es mínimo (8,66%) por lo que podemos decir que Glucantime no tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular.

3. Efecto del EAE sobre la producción de INF- inducida por Con A.-



Gráfica N° 3. Producción de INF- inducida por Con A en los diferentes grupos de la población de estudio

Para determinar el efecto del EAE sobre la producción de INF- inducida por Con A en los diferentes grupos de estudio, se analizaron los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares por el método de ELISA. Cabe recalcar que en este caso el **Grupo N° 1 (inmunizado)** se utilizó también como control, pero esta vez de la producción de INF- sobre el cual se realizaron todos los análisis.

En la Gráfica N° 3 se observan los resultados obtenidos en este ensayo, donde:

a) Los grupos **inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL y 0,125mg/mL** respectivamente, son estadísticamente diferentes ($p = 0,005$; $x = 9704\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 91,92$ y $p = 0,003$; $x = 12005\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 28,28$) comparándolos con el control ($x =$

23311pg/mL; \pm DS = 176,77). Estos resultados muestran que el EAE inhibe también la producción de INF- .

b) El **grupo inmunizado y tratado con Glucantime** no muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,09$; $x = 19083$ pg/mL; \pm DS = 176,77) respecto al control, estos resultados muestran que Glucantime no tiene ningún efecto sobre la producción de INF- .

c) El **Grupo tratado con EAE a 0,25mg/mL** muestra una diferencia significativa ($p = 0,003$; $x = 10950$ pg/mL; \pm DS = 70,71) respecto al control, este grupo nos permite evaluar como en el caso de proliferación celular el efecto *in vivo* del EAE sobre la producción de INF- (inhibición), además, si comparamos éste con el grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL, vemos resultados similares debido a la dosis de EAE utilizado en estos dos grupos.

d) El **Grupo sin inmunización ni tratamiento** no muestra una diferencia significativa ($p = 0,1$; $x = 20035$ pg/mL; \pm DS = 70,71) respecto al control. Estos resultados reflejan la respuesta natural de las células frente a un estímulo que en este caso es Con A.

Comparando los resultados obtenidos con Glucantime y el EAE como en el caso anterior, se observa también que Glucantime no tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de INF- como sucede con el EAE existiendo una diferencia significativa con el grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL ($p = 0,01$), la diferencia no es significativa con el grupo inmunizado y tratado con EAE a 0,125mg/mL ($p = 0,06$). La diferencia con ambos grupos probablemente se debe a la concentración del EAE utilizado en el tratamiento *in vivo*.

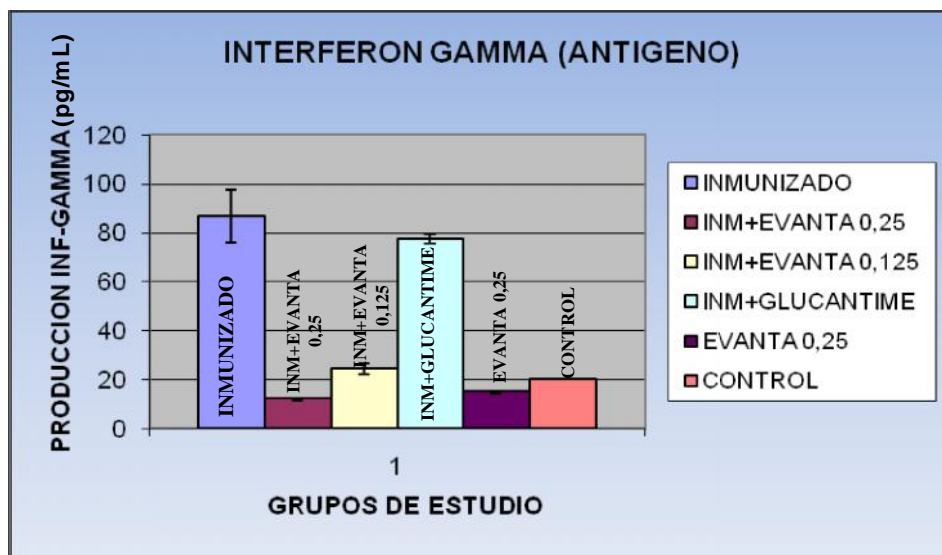
TABLA N° 3
PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PRODUCCION DE INF- INDUCIDA
POR CON A EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION DE
ESTUDIO

GRUPOS DE ESTUDIO	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inmunizado + Evanta 0,25mg/MI	58,37%
Inmunizado+ Evanta 0,125mg/MI	48,50%
Inmunizado + Glucantime	18,14%

En la tabla N°3 podemos observar el porcentaje de inhibición de la producción de INF- inducida por Con A, estos resultados muestran una mayor inhibición (58,37%) a **0,25mg/ml** de EAE respecto a la de **0,125mg/mL** cuyo porcentaje de inhibición es de 48,51%.

El porcentaje de inhibición del **grupo inmunizado y tratado con Glucantime** (18,14%) nos muestra que éste no tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de INF- .

4. Efecto del EAE sobre la producción de INF- inducida por el Antígeno de Leishmania.-



Gráfica N° 4. Producción de INF- inducida por el antígeno de Leishmania en los diferentes grupos de la población de estudio

TABLA N° 4

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA PRODUCCION DE INF- INDUCIDA POR EL ANTIGENO DE LEISHMANIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE LA POBLACION DE ESTUDIO

GRUPOS DE ESTUDIO	PORCENTAJE DE INHIBICION
Inmunizado + Evanta 0,25mg/MI	86,02%
Inmunizado+ Evanta 0,125mg/MI	71,76%
Inmunizado + Glucantime	10,4%

El efecto del EAE sobre la producción de INF- inducida por el antígeno de Leishmania se muestran en la Gráfica N° 4 y Tabla N°4, en esta última se observan los porcentajes de inhibición de la producción de INF- donde:

a) Los resultados del grupo **inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL** muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,03$; $x = 12,1\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 0,56$) comparada con el control y un mayor porcentaje de inhibición de la producción de INF- ($86,02\%$), si comparamos estos resultados con el grupo **inmunizado y tratado con EAE a 0,125mg/mL** vemos que este último también muestra una diferencia significativa ($p = 0,05$; $x = 24,45\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 2,15$) respecto al control, pero el porcentaje de inhibición de la producción de INF- ($71,76\%$) es menor debido a la concentración del EAE utilizado en el tratamiento.

b) Los resultados del grupo **inmunizado y tratado con Glucantime** no muestra una diferencia significativa ($p = 0,08$; $x = 77,55\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 1,8$) comparado con el control; y el porcentaje de inhibición ($10,4\%$) muestra que Glucantime no tiene efecto inhibitorio sobre la producción de INF- .

c) El grupo **tratado con EAE a 0,25mg/mL** nos muestra una diferencia significativa ($p = 0,004$; $x = 15,05\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 0,49$), comparada con el control, estos resultados nos reflejan la respuesta de las células al estímulo (antígeno de Leishmania) ya que estas no presentan memoria inmunológica.

d) Los resultados obtenidos en el grupo **sin inmunización ni tratamiento** como en el caso anterior muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,003$; $x = 20\text{pg/mL}$; $\pm\text{DS} = 0$) comparada con el control, estos resultados nos indican que las células no conocen al antígeno por lo que no responden a su estímulo.

XII.- DISCUSION.-

La Leishmaniasis es un problema de salud pública a nivel mundial cuyo control hasta el momento se ha realizado a través del uso de antimoniales pentavalentes como Glucantime en las tres formas de Leishmaniasis y Anfotericina B en casos de cepas resistentes y Leishmaniasis visceral. Como se mencionó en otro capítulo, estos componentes no son fácilmente accesibles para la población que la padece por su disponibilidad y costo y, además, porque presentan una toxicidad elevada ^{5, 10, 12, 16}. Por esta razón, la búsqueda de otros componentes menos tóxicos y de fácil acceso a la población ha llevado a buscar nuevas alternativas terapéuticas contra este mal cuyas características permitan el reemplazo de las anteriores.

El estudio de Evanta ha llevado a conocer que esta planta tiene un efecto leishmanicida ^{4, 50, 51, 52, 53, 54}. Sin embargo, se sabe que el sistema inmune es fundamental en el control de la infección por *Leishmania* puesto que la inmunidad mediada por células juega un rol central en la respuesta a patógenos intracelulares. Este tipo de respuesta (Th_1) protege contra la mayor parte de formas de Leishmaniasis; sin embargo, una inadecuada modulación de una respuesta Th_1 puede producir una expansión clonal exagerada de células T reactivas, las que pueden estimular la producción de INF- que puede, a su vez llevar a una reacción exagerada y contribuir a la inmunopatogenesis ⁵⁹.

Muchas drogas utilizadas para el control de enfermedades infecciosas han mostrado que no solo eliminan al patógeno sino que modifican la respuesta inmune, es por esta razón que en un estudio anterior se propuso que la cura de la Leishmaniasis no solo se debía al efecto de Evanta sobre el parasito sino a una combinación con un efecto Inmunomodulador ^{2, 8}.

El proyecto Enfermedades Infecciosas Nuevas Estrategias terapéuticas: “Evanta en el tratamiento de la Leishmaniasis” ha permitido el estudio del EAE sobre la respuesta inmune. Los estudios *in vitro* realizados anteriormente acerca de la acción del EAE sobre la respuesta inmune en especial sobre la proliferación celular y producción de citoquinas (INF-) sugieren que el EAE tiene un efecto Inmunomodulador ^{2, 8}.

Los estudios *in vivo* realizados en este trabajo, muestran el mismo efecto, el cual fue evaluado a través de la inmunización y tratamiento *in vivo* de ratones hembras de la cepa BALB/c y la reactivación *in vitro* de las células obtenidas de cada uno de los grupos de estudio analizando el efecto del EAE sobre la proliferación celular y producción de INF- γ .

En este estudio se utilizaron 6 grupos de ratones de la cepa Balb/c; el grupo **inmunizado** sirvió como un parámetro de comparación que en este caso fue llamado control ya que éste, al ser inmunizado, solamente nos permitió evaluar la respuesta frente a un estímulo tanto *in vivo* (inmunización con antígeno de leishmania) como *in vitro* (reactivación con Con A y antígeno de leishmania) sin haber tenido contacto con el EAE, entonces, tanto la proliferación celular como la producción de INF- γ en este grupo fue considerado como el 100% de ambas respuestas.

Además de este control se incluyeron otros controles internos: el grupo **sin inmunización y tratado con EAE a 0,25mg/mL** con el cual se reflejó el efecto *in vivo* del extracto, y el grupo **sin inmunización ni tratamiento** (grupo control sano) en el que se observó una reacción natural de las células a cualquier estímulo (Con A y antígeno de leishmania), por un lado, Con A como un activador policlonal en presencia del cual, toda célula viva prolifera, y por otro lado el antígeno de leishmania al que solo las células que fueron activadas responden a dicho antígeno.

Al analizar el efecto del EAE sobre la proliferación celular inducida por Con A en los grupos **inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL y 0,125mg/mL** respectivamente, vemos que existe inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis del EAE utilizado en el tratamiento *in vivo* comparado con el control (datos estadísticamente diferentes). Estos resultados son similares a otros estudios *in vitro* realizados^{2, 45} que muestran que la inhibición de la proliferación celular depende de la dosis del extracto utilizado (mayor dosis – mayor inhibición).

Sabemos que un control inadecuado de la respuesta inmune en la Leishmaniasis puede provocar una proliferación exagerada de las células (reacción inflamatoria crónica)^{2, 45},

por lo que la inhibición de la proliferación producida por el EAE podría ser responsable de controlar, de alguna manera, dicha respuesta observada en la Leishmaniasis.

Analizando los resultados obtenidos en el grupo inmunizado y tratado con Glucantime, vemos que éste no muestra un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, la diferencia entre este grupo y el control no tratado es mínima por lo que no son estadísticamente diferentes. El mismo efecto se observó en otros estudios², en los que Glucantime no mostró actividad inhibitoria en la proliferación celular; por el contrario, otros estudios mostraron una estimulación de la respuesta inflamatoria en pacientes tratados con Glucantime⁶⁰.

Al analizar el efecto del EAE sobre la proliferación celular inducida por el **antígeno de leishmania** se vió que la inmunización con dicho antígeno fue efectiva, esto se corrobora cuando las células del grupo inmunizado al tomar contacto nuevamente con el mismo antígeno, pero esta vez *in vitro*, proliferan porque las células ya conocen al antígeno, esta es una reacción natural de las células que presentan memoria inmunológica. En este caso, este grupo también fue considerado como un parámetro de comparación (control) cuyo porcentaje de proliferación representó el 100% de respuesta al estímulo.

Comparando la proliferación celular inducida por Con A y el antígeno de leishmania, los resultados muestran que la proliferación celular inducida por Con A es mucho mayor que la inducida por el antígeno de Leishmania, esto se debe a que la Con A es un activador policlonal que actúa sobre toda célula viva.

Analizando el efecto del EAE en los grupos **inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL y 0,125mg/mL** respectivamente, se observa que la respuesta sobre la proliferación celular inducida por el antígeno de Leishmania es también “Dosis – dependiente” ya que se observa mayor inhibición de la proliferación en el grupo tratado a mayor dosis con una reducción de la respuesta proliferativa del 73,14% y 62,18% a concentraciones de 0,25 y 0,125mg/mL respectivamente.

Al utilizar Glucantime en el tratamiento *in vivo* y posteriormente reactivado *in vitro* con el antígeno de Leishmania, se observó que no tiene efecto inhibitorio sobre la

proliferación celular; al contrario, al igual que en el caso anterior (estimulación con Con A) y corroborando con otros estudios, se podría hablar de estimulación de la respuesta proliferativa y no de inhibición^{2, 60}.

Comparando el efecto de Glucantime y el EAE sobre la respuesta proliferativa y la producción de INF- γ , los resultados muestran el Glucantime no tiene ningún efecto sobre estos efectores de la respuesta inmune, al contrario del efecto producido por el EAE el cual tiene un efecto inhibitorio tanto sobre la proliferación celular como en la producción de INF- γ .

Como se mencionó líneas arriba, la respuesta de tipo Th₁ protege contra las diferentes formas de Leishmaniasis y un inadecuado control permitiría una proliferación exagerada de células T con la consecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF y INF- γ ocasionando el daño tisular característico de esta enfermedad^{2, 59}, es por esta razón que se vio por conveniente analizar además el efecto del EAE sobre la producción de INF- γ .

Examinando los resultados de cada uno de los grupos de estudio, respecto al efecto del EAE sobre la producción de INF- γ , estimulado con Con A y el antígeno de leishmania, al igual que en el caso anterior, el grupo inmunizado fue utilizado como un parámetro de comparación (control) el que representó en este caso el 100% de la producción de INF- γ , sobre el cual se realizaron todas las comparaciones.

Los resultados obtenidos en los grupos **inmunizado y tratado con EAE a 0,25mg/mL y 0,125mg/mL** respectivamente comparados con el control, nos muestran una diferencia significativa, es decir que el extracto afectó la producción de INF- γ . Estos resultados nos muestran, además, que la inhibición de la producción de INF- γ depende de la concentración del EAE utilizado en el tratamiento. Al igual que en la respuesta proliferativa, el efecto es Dosis – Dependiente; estos resultados se comparan con otros estudios^{2, 8}, donde el efecto *in vitro* del EAE observado sobre la producción de INF- γ y la proliferación celular inducida por Con A depende de la dosis (Dosis – Dependiente), estos resultados sugieren un efecto específico inhibitorio del extracto sobre las células T. La respuesta generada al utilizar Con A como estimulante es mayor respecto a la

generada por el antígeno de Leishmania, esta diferencia puede deberse también a que la Con A es un activador policlonal donde toda célula viva responde a este estímulo ⁴⁵.

Al igual que el análisis anterior referente al efecto de Glucantime sobre la proliferación celular, nuestros resultados muestran que no tiene efecto inhibitorio sobre la producción de INF- inducida por Con A y el Antígeno de Leishmania, al contrario parece ser más bien un efecto estimulador cuyos resultados se comparan con otros estudios ^{2,60} donde se observó que Glucantime incrementa la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IL-6, IL-8 e INF- ⁶⁰. Últimos estudios demuestran que el Glucantime no tiene ningún efecto sobre la respuesta inmune, pero si sobre el parásito por lo que es un potente leishmanicida.

Los resultados de este estudio muestran que el EAE utilizado *in vivo*, inhibe tanto la proliferación celular como la producción de INF- inducida por Con A y el antígeno de leishmania lo que nos indica que el EAE al mismo tiempo de actuar sobre el parásito (efecto ya confirmado), puede actuar sobre la respuesta inmune controlando la producción exagerada de estos componentes que son los responsables de las manifestaciones patológicas que llevan al daño tisular ^{10,13}.

Estudios realizados anteriormente para evaluar el efecto Inmunomodulador de diferentes sustancias frente a la Leishmaniasis y otras afecciones crónicas muestran que existe un efecto inhibitorio de la respuesta proliferativa, inhibición de amastigotes dentro del macrófago, así como de la producción de citoquinas pro inflamatorias ^{44, 47, 48}, comparando los resultados de este estudio con los anteriores, podemos mencionar que el EAE posee el mismo efecto que estas sustancias.

Tomando en cuenta cada uno de nuestros resultados se sugiere que el extracto de Evanta podría ser una excelente alternativa para el tratamiento de la Leishmaniasis el cual debido a su efecto Inmunomodulador podría controlar la respuesta inflamatoria crónica de la enfermedad y al mismo tiempo eliminar al parásito, además, su accesibilidad y bajo costo permitiría el uso frecuente por parte de la población que padece la enfermedad.

Sería muy importante realizar otros estudios *in vivo* que nos permitan apoyar los resultados de esta investigación analizando el efecto del EAE en otros componentes del sistema inmune. Para esto, sería necesario descartar la posibilidad de que se trate de un efecto inmunotóxico (o citotóxico simplemente) que podría reflejar los resultados encontrados en éste y otros trabajos.

XII. CONCLUSIONES.-

- ✓ Se logró evaluar la reactivación de linfocitos provenientes de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con el antígeno de Leishmania y tratados con el EAE utilizando Con A y antígeno de Leishmania como estimulantes de la proliferación celular y la producción de INF- donde se pudo ver la respuesta de las células de los diferentes grupos de estudio frente a Con A y el antígeno de Leishmania.
- ✓ El EAE posee un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular inducida por Con A y el antígeno de Leishmania, dicho efecto es Dosis – Dependiente (a mayor dosis, mayor efecto inhibitorio).
- ✓ El EAE posee también un efecto inhibitorio Dosis – dependiente sobre la producción de INF- inducida por Con A y el antígeno de Leishmania.
- ✓ El Glucantime no posee un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y producción de INF- al contrario de lo observado con el EAE.

XIII. RECOMENDACIONES.-

Se han realizado importantes avances acerca del efecto del extracto de Evanta tanto sobre el parásito de Leishmania como sobre la respuesta inmune generada en la enfermedad. Sin embargo, aún nos queda mucho por estudiar ya que todos los datos que se tienen hasta el momento son el resultado de estudios *in vitro*, el presente trabajo es uno de los primeros estudios *in vivo* donde observamos que el EAE utilizado como tratamiento, tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y producción de INF- γ , lo que nos sugiere que Evanta podría ser una alternativa para el tratamiento de la Leishmaniasis, por un lado, debido a su efecto Inmunomodulador que controlaría la respuesta inflamatoria y, por el otro, debido a su efecto leishmanicida que permitiría la eliminación del parásito. Sin embargo, como ya se mencionó líneas arriba, es necesario realizar otros estudios *in vivo* analizando el efecto del EAE sobre otros componentes del sistema inmune que participan en la respuesta frente a Leishmaniasis (IL-10, IL-17, TGF- β) que nos ayuden a corroborar nuestros resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- MUÑOZ, Ana María; PAREJA, Bertha. 2003 “Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de la Leishmaniasis”, Folia Dermatológica Peruana.
- 2.- CALLA-CARRASCO, Jacqueline; TROYE-BLOMBERG, Marita; FERNANDEZ, Carmen. 2006 “El extracto de alcaloides de *Galipea Longiflora* (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro – inflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral e Interferón- *in vitro*”, Biofarbo, Vol 14.
- 3.- RUIZ PINELL, Grace *; RÍOS TERÁN, Cecilia; NAVARRO GUARACHI, Elvira; ÁVILA ILLANES, Juan Antonio. 2009. “Actividad citotóxica *in vitro* en líneas celulares y células de sangre periférica humana de los alcaloides totales de corteza de *Galipea Longiflora* (Evanta)”. Revista Boliviana de Química. Vol. 26. N° 2.
- 4.- RODRIGUEZ MANRIQUE, Mirtha; GIMENEZ TURBA Alberto, AVILA ILLANES Juan Antonio: “Determinación de la actividad antibacteriana de especies guaraníes y evaluación de la toxicidad *in vivo* de la *Angostura longiflora* (Evanta). La Paz IIFB – FCFB.
- 5.- MOLLINEDO Sergio, MONASTERIOS Heydi. 2007. LEISHMANIASIS, “Guía operativa para el control en Bolivia. La Paz, Unidad de Epidemiología, Programa Nacional de control de la Leishmaniasis.” Comité de Identidad Institucional – Ministerio de Salud y Deportes; disponible en: smollinedo@sns.gov.bo.
- 6.- AVILA ILLANES Juan Antonio; GIMENEZ TURBA Alberto: “Estudio preclínico de la Evanta *Galipea longiflora* Krause mediante modelos toxico cinéticos. TESIS DE MAESTRIA. La Paz I.I.F.B. – F.C.F.B.
- 7.- FOURNET A., ANGELO A., MUÑOZ V. 2006 “Rigor científico confirma valor curativo de la Evanta” Centro de Noticias OPS/OMS, Bolivia.

- 8.- CALLA MAGARIÑOS, Jacqueline; GIMENEZ, Alberto; TROYE BLOMBERG Marita; FERNANDEZ Carmen. 2008 “Un extracto de alcaloides de *Evanta* utilizado tradicionalmente como agente leishmanicida en Bolivia inhibe la proliferación celular y la producción de Interferón gamma en células activadas”. *Escandinavian Journal of Immunology*, Vol. 69.
- 9.- LLANOS MEDINA, Fabiola y Col. 2009. “Extracción acuosa de corteza de *Galipea longiflora* y su actividad leishmanicida” *Biofarbo*. Vol.17 N° 2.
- 10.-URIBARREN BERRUETA, Teresa. 2011. “Recursos en Parasitología - Leishmaniasis” Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Revisión de tema.
- 11.- Grau, G.E., 1991; Caña, E.S., 1993; Locksley et al, 1992
- 12.- CARRION HERRERO, Javier. 2007. “Establecimiento de un modelo experimental para el estudio de la Leishmaniasis. Estrategias de inmunización con las histonas de *Leishmania* frente a la Leishmaniasis cutánea y visceral”. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular. Memoria para optar al grado de doctor.
- 13.- AGUDELO, Sonia del Pilar; ROBLEDO, Sara. 2000 “Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania spp*”. Revisión de tema. *Iatreia*. Vol 13, N° 3.
- 14.- BOTERO David, RESTREPO Marcos, 2005. “Parasitosis Humanas”, Cuarta Edición, Corporación para investigaciones biológicas, Colombia.

15.- ROSILVED R*, SILVA B. 2008. “Factores de riesgo involucrados en la infección por *Leishmania infantum* / *L. chagasi*”. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Vol.39 N° 2.

16.- GIL, Eric; CUNHA Luiz C; GONÇALVES Aurélia; SOUZA Aparecido; VALDERRAMA NEGRÓN Ana. 2007. “Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis”. Latin American Journal of Pharmacy. Vol 26, N° 3.

17.-UMSA: IIFB-IIQ-IBBA, FONAMA-EIA. Tacana. 1999. “Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas”. La Paz: Centro de información para el desarrollo.

18. PALOMO Iván, FERREIRA Arturo, 1998. “Fundamentos de Inmunología”, editorial Universidad de Talca, Chile.

19.- MARGNI, Ricardo Aníbal. 1996. “Inmunología e Inmunoquímica”. Quinta Edición, Editorial medica Panamericana. Buenos Aires Argentina.

20.- “Mecanismos inmunitarios frente a bacterias y parásitos”. Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca074.htm>.

21.- “El sistema inmune innato II: La primera respuesta frente a la infección” 2008. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. Vol. 2 N°1. Disponible en: <http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?n>

22.- Leishmaniasis. Tratamiento. Disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-leishmaniasis-cutanea/leishmaniasis-tratamiento>

23.- HERNANDEZ RUIZ Joselín, M en C, BECKER Ingeborg. 2006 “Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea”. Salud Pública; Vol. 48 N° 5.

24.- Definiciones de proliferación celular, disponible en:
<http://www.definicionesdemedicina.com/proliferacion/>

25. Medicina Molecular. Términos del glosario. Disponible en:
<http://www.medmol.es/glosario/104/>

26.- Vybrant MTT Cell proliferation Assay Kit.”1000 assays”. Cat N° V-13154.

27.- SUAREZ A., MOZO L., GUTIERREZ Martín. 2010. “Citocinas”. Inmunología en Línea. Universidad de Córdoba. España.

28.- ABBAS A., LICHTMAN A., PILLAI S. 2008. "Inmunología Celular y Molecular". Sección IV: Mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias; Citocinas. Sexta Edición.

29.- ROITT Iván. 1998. “Inmunología. Fundamentos”. Novena Edición. Editorial Médica Panamericana.

30.- IAÑEZ PAREJA, Enrique. 1999. “Curso de Inmunología general: 14. Citoquinas”. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. España. Disponible en:
http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_14.htm

31.- RODRIGUEZ, Juan Manuel. SANGUINETI DIAZ, Ana Cecilia. NUÑEZ VERGARA Guillermo. “Inmunodermatología: Citoquinas y Piel (Parte I)”

32.- CABRERA, Maira; TERAN, Guillermo. 2010. “Citocinas reguladoras (IL-10 y TGF-) en pacientes con Leishmaniasis cutánea Americana”. Boletín de Malariología y salud ambiental. Vol. 50, N° 2.

33.- <http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Interferon-gamma>

34.-http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=Page&ID=1C8DEDA2-C779-438D-9B7F-1E5DF961ACE0&WT.mc_id=go_IFNgELISA_pw

35.- <http://hea.wyzgo.es/index.php?PageURL=articles/i/n/t/Interferon-gamma.php>

36.- CABRERA GONZALES* Maira, TERAN-ÁNGEL Guillermo, RODRIGUEZ Orquídea, PUCCIO Franca, ZERPA Olga & CONVIT Jacinto. 2010. “Citocinas reguladoras (IL-10 y TGF-) en pacientes con leishmaniasis cutánea Americana”. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Vol. 50, N° 2.

37.- ..Tipos de ELISA. Disponible en: <http://www.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>

38.-Fases de un ensayo ELISA. Disponible en: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/W/Welcome.html>

39.- De Wikipedia, la enciclopedia libre.” ELISA”. 2011. Disponible en: [http://www.Wikipedia, la enciclopedia libre.mht](http://www.Wikipedia,laenciclopedia Libre.mht).

40.- ROSE Noel, “El laboratorio de Inmunología Clínica”: Análisis por enzimas fijadas a inmunoabsorbentes. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina.

41.- Fundamentos y Tipos de ELISAs. Disponible en: www.cultek.com

- 42.- ELISA for Mouse Interferon- . MABTECH: Product Code: 3321-1A-20.
- 43.- L. R. V. ANTONELLI*, W. O. DUTRA†, R. P. ALMEIDA‡, O. BACELLAR‡ & K. J. GOLLOB*. 2004. “Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation” *Department of Biochemistry- Immunology and † Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte and‡Immunology Service, Hospital Edgar Santos, UFBA-Salvador, BA, Brazil.* Clin Exp Immunol.
- 44.- LLANOS, Alejandro. 2011. “Leishmaniasis: Nuevas Alternativas Terapéuticas” Facultad de Salud Pública y Administración. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- 45.- VELASQUEZ, Rianed. 2006 “Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Leishmaniasis muco cutánea”. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Medicina. Tesis de Maestría en Parasitología..
- 46.- CASTES Marianela. 2010. “Inmunología de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana” Instituto de Biomedicina, Cátedra de Inmunología, Escuela J.M. Vargas Félix J. Tapia Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Central de Venezuela.
- 47.- S. KAR, G. SHARMA. 2011. “Fucoidan cures infection with both antimony-susceptible and -resistant strains of Leishmania donovani through Th1 response and macrophage-derived oxidants”. Laboratorio de Biología celular y Molecular, División de Enfermedades infecciosas e Inmunología, Kolkata, India. Vol. 66 N° 3.
- 48.- BANERJEE A, ALI N. 2011. “Combination Therapy with Paromomycin-Associated Stearylamine-Bearing Liposomes Cures Experimental Visceral Leishmaniasis through Th1-Biased Immunomodulation”. Laboratorio de Biología

celular y Molecular, División de Enfermedades infecciosas e Inmunología, Kolkata, India. Vol. 55 N° 4.

49.- PAZ, Magali. 1998. "Evaluación citotóxica/citostática, antibacteriana, antifúngica y cultivo in vitro de *Galipea Krause*" Tesina de la carrera de Bioquímica.

50.- FOURNET A. Y COL. 1989: " Aryl-2 et alkyl-2 quinoleines nouvelles isolées d' une rutacee bolivienne : *Galipea longiflora* »

51.- FOURNET A. Y COL. 1993: " Les chimaninas, nouvelles quinoleines substitues en 2- isolees D' une plante Bolivianne antiparasitaire : *Galipea longiflora* ". Journal of National Products. Vol 56. No 9

52.- A FOURNET y col.1994. "The activity of 2- substituted quinoline alcaloides in Balb/c mice infected whit *Leishmania donovani*"

53.- FOURNET A, Ferreira ME, Rojas A, Torres S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R;1996. "In Vivo Efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines in Experimental Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. Antimicrob Agents Chemother ». Vol.40 N° 11.

54.- Patentes. Disponible en: <http://www.Patentes.ibm/cgi-bin/viewpat.cmd/us05541196>

55.- .BOURDY, G.; DEWALT, S.J.; CHAVEZ de Michel, L.R.; ROCA, A.; DEHARO E.; MUÑOZ, V.; BALDERRAMA L.; QUENEVO C.; GIMENEZ A. 2000. "Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group" Journal of Ethnopharmacology.

56.- Proyecto Multilateral OEA. 2004 “Flora Regional como Fuente de Fármacos contra Parásitos, Hongos y Cáncer”. Coordinador CIFLOPAN de Panamá y participación de Argentina, Bolivia, Colombia y Guatemala.

57.- Proyecto CYTED-X.5. 2003. “Búsqueda Obtención y evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios” Subprograma X, Química Fina Farmacéutica.

58.- SALAMANCA, Efrain; RUIZ, Grace; TICONA, Juan Carlos; GIMENEZ, Alberto 2008. “Método colorimétrico – XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad Leishmanicida.”. Biofarbo. Vol.16.

59.- BACELLARY O., LESSA H., SCHRIEFER A., MACHADO P., RIBEIRO DE JESUS A., DUDRA WO., CARVALHO E and GOLLOB K. 2002. “Up regulation of Th₁ type responses in mucosal leishmaniasis patients infec Immunity”.

60.- KOCYIGIT A., GUR S., GUREL M., BULUT V. and ULUKANLIGIL M. 2002. “Antimonial Therapy induces circulating pro-inflammatory cytokines in patients with cutaneous Leishmaniasis. Infect immune”.

ANEXOS

ANEXO N° 1.-

PREPARACION DEL MEDIO RPMI.-

Para 500 ml de medio RPMI, pesar:

- ✓ 8,175g de RPMI
- ✓ 1g de Bicarbonato de Sodio
- ✓ Ambos disolver en agua destilada, un vez disuelto, la solución debe tener un color rosado salmón
- ✓ En la campana de flujo laminar, filtrar la solución
- ✓ A la solución filtrada adicionar 5mL de glutamina, 2,5mL de penicilina/estreptomicina (Pest) y 50mL de Suero Fetal Bobino (SFB) inactivado
- ✓ Alicuotar en tubos falcon de 50mL estériles y congelar.

ANEXO N° 2.-

PREPARACION DEL BUFFER PBS 0,15 M pH 7,4.-

Para preparar 1000 mL, pesar:

- ✓ 2,437 gr de KH_2PO_4
- ✓ 8,09 gr de NaHPO_4
- ✓ 4,38 gr de NaCl .

Disolver cada uno por separado y luego mezclar en un matraz aforado de 1000 mL, ajustar el pH a 7,4 con NaOH concentrado, para aforar posteriormente.

ANEXO N° 3.-

PREPARACION DE ACIDO CLORHIDRICO (HCl- 0,01M)

Para la preparación de HCl 0,01M, se utiliza HCl stock previamente diluido a una concentración de 0,1M, posteriormente diluir hasta llegar a la dilución final de 0,01M utilizando la siguiente formula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

ANEXO N° 4.-

CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO PIROGALOL.-

Una vez atemperados los reactivos, se siguió el siguiente protocolo:

- En tres tubos marcar: Blanco, estándar y muestra
- A los tres tubos se añade 300uL de reactivo (Solución de rojo pirogalol 50 mmol/l y molibdato de sodio 0,04 mmol/l, pH = 2.5.)
- Al tubo blanco se añade 5uL de agua
- Al tubo estándar se añade 5uL del estándar (Solución de albúmina 100 mg/dl)
- Al tubo muestra se añade 5uL de muestra (antígeno de leishmania obtenido por el método de Congelación/Descongelación y Sonicación)
- Homogeneizar cada uno de los tubos por inversión y llevar a incubación por 10min. a 37°C
- Después de los 10min. leer la absorbancia con blanco reactivo con la ayuda de un Spectrofotómetro a 600nm de longitud de onda
- Posteriormente calcular la concentración de proteínas en la muestra a través de la siguiente formula:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times [\text{estándar}]$$

ANEXO N° 5.-

RECuento Y Viabilidad Celular A Traves Del Ensayo De Exclusion De Colorante Azul Tripán.-

Para determinar la viabilidad celular se procedió de la siguiente manera:

- Realizar una previa dilución 1:10 del colorante Azul Tripán 0,2% con Buffer PBS 0,1M, esto para evitar muerte celular por toxicidad de dicho colorante

- A la vez, realizar una previa dilución 1:10 de las células obtenidas de bazo de ratones hembras de la cepa Balb/c con medio RPMI
- En un tubo, colocar 90uL del colorante diluido y añadir 10uL de células previa dilución, mezclar, esperar unos 3 minutos y proceder al ajuste
- Cargar la mezcla a una cámara de Neubauer y realizar el recuento en el cuadrante de glóbulos blancos
- La viabilidad celular se calcula mediante el número de linfocitos vivos dividido entre el número total de linfocitos y luego multiplicar por 100.

$$\frac{\text{Linfocitos vivos}}{\text{Número total de linfocitos}} \times 100$$

ANEXO N° 6.-

ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR: MTT.-

El Kit contiene:

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (Componente A),
10 viales, cada uno contiene 5 mg.
- SDS sodium dodecyl sulfate (Componente B), 10 viales, cada uno contiene 1mg,

utilizado para disolver los cristales de formazán.

Este kit debe ser guardado a 4°C, protegido de luz.

Otros reactivos requeridos:

- Buffer Fosfato Salino (PBS), estéril.
- HCl, 0.01 M

El procedimiento es el siguiente:

- Pasadas las 48hrs de incubación, se procede a centrifugar la placa 8min a 1200rpm.
- Dentro de la campana de flujo laminar, quitar cuidadosamente 180uL del sobrenadante y guardar en tubos eppendorfs debidamente identificados para la cuantificación de INF-
- En la placa, a cada pozo adicionar 180uL de medio RPMI sin rojo fenol
- A cada pozo adicionar 10uL de MTT previamente disuelto en 1mL de Buffer PBS 0,1M estéril
- Incubar 4hrs a 37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad
- Pasado este tiempo, adicionar a los pozos 100uL de SDS previamente disuelto en 10mL de HCl 0,01M estéril
- Incubar toda la noche a 37°C, 5% de CO₂ y 98% de humedad
- Mezclar cada uno de los pozos antes de la lectura
- Leer la placa en un lector de ELISA a 545nm con filtro diferencial de 630nm.

ANEXO N° 7.-

DETECCION DE INTERFERON GAMMA (INF-) EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS CELULARES.-

El Kit contiene:

- 1 vial con 500uL de anticuerpo monoclonal, concentración: 1mg/mL
- 1 vial con 250uL de anticuerpo monoclonal biotilado, concentración: 1mg/mL
- 1 vial con 2ug de Estándar de **INF-** de ratón (reconstituir con 20uL de PBS, BSA y Tween) llegando a una concentración de 0,1mg/mL

Otros materiales y reactivos requeridos:

- Placas de ELISA de 96 pozos
- Buffer PBS 0,1M pH:7,4
- BSA 0,1%
- Tween-20 0,05%

- Enzima Peroxidasa
- Cromógeno – Sustrato (Tetrametil bencidina – Peróxido de hidrogeno)

El procedimiento es el siguiente:

Día 1.

- Sensibilizar las placas con el primer anticuerpo monoclonal a una concentración final de 1ug/mL. De acuerdo al número de pozos, preparar el volumen necesario del anticuerpo monoclonal en Buffer PBS 0,1M pH:7,4 y colocar 100uL/ pozo e incubar toda la noche a 4°C

Día 2.

- Lavar los pozos dos veces con 200uL de Buffer PBS 0,1M pH:7,4
- Bloquear las placas con Buffer de incubación el que contiene Buffer PBS 0,1M pH:7,4 y BSA 0,1%, colocar 200uL/pozo e incubar 1 hora a temperatura ambiente
- Lavar las placas 5 veces con 200uL/pozo de buffer de lavado el que contiene Buffer PBS 0,1M pH:7,4 y Tween-20 0,05%
- Preparar el estándar de INF- de ratón a una concentración final de 10ug/mL (solución stock)

Se debe realizar una curva estándar para la interpolación de los resultados hallados en los cultivos celulares, para esto:

- Preparar diluciones seriadas de la solución stock partiendo de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6pg/mL, de cada dilución colocar 50uL/pozo
- A la vez, colocar 50uL de las muestras (sobrenadantes de cultivos celulares: Cultivos con Con A realizar una previa dilución 1/10 con buffer de dilución el que contiene Buffer PBS 0,1M pH:7,4 y BSA 0,1%), incubar toda la noche a T° ambiente

Día 3.

- Lavar las placas 5 veces con 200uL de buffer de lavado
- Colocar el segundo anticuerpo biotilado a una concentración final de 0,5ug/mL De acuerdo al número de pozos, preparar el volumen necesario del anticuerpo

monoclonal biotinilado en Buffer de dilución y colocar 100uL/ pozo e incubar 1 hora a T° ambiente

- Lavar las placas 5 veces con 200uL/pozo de buffer de lavado
- Colocar 100uL/pozo de la enzima Peroxidasa previo una dilución 1/200 en buffer de dilución e incubar 1 hora a T° ambiente
- Lavar las placas 5 veces con 200uL/pozo de buffer de lavado
- Colocar el cromógeno – sustrato (vol/vol) es decir de acuerdo al volumen necesario mezclar el mismo volumen del cromógeno y mismo volumen del sustrato en un tubo, de la mezcla colocar 100uL/pozo e incubar 10min hasta que tome color
- Leer las placas en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450nm con filtro diferencial de 630nm.
- Con las diluciones seriadas del estándar se realiza una curva la cual nos sirve de base para la interpolación de los resultados hallados.

ANEXO N° 8.-

CURVA ESTANDAR DE INF- .-

