

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE SERVICIO DE LABORATORIO EN DIAGNOSTICO E  
INVESTIGACION EN SALUD**



**EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO DEL  
EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA SOBRE  
LA ACTIVIDAD DE NEUTRÓFILOS EN MODELO  
MURINO**

**ELABORADO POR:**

**Lic. GLADYS ELSA PÉREZ COCARICO**

**ASESORA:**

**MSc., PhD. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS**

**TESIS DE ESPECIALIDAD**

**LA PAZ – BOLIVIA  
2014**

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

Filipenses 4:13

## DEDICATORIA

A mis queridos Padres Santiago Pérez y Francisca Cocarico por su amor, paciencia, comprensión y el apoyo constante que me brindaron a lo largo de mi vida.

A mi hermano Juan Carlos y mis queridos sobrinos, que siempre estuvieron pendientes de mí.

A mi querida tía Carmen Rosa y primo Iván por apoyarme y confiar en mí.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por haberme dado la vida, por regalarme una familia y ayudarme en cada paso que doy.... ¡Gracias!

A mis amados padres Santiago y Francisca, por su amor, comprensión, confianza y su apoyo incondicional en todo momento.

A mi Hermano Juan Carlos y su esposa Angélica, que a pesar de la distancia, siempre me brindaron su apoyo incondicional para lograr esta meta.

A mis queridos sobrinos Camila, Bryan y Sheyla que siempre me sacaron una sonrisa en los momentos difíciles, son tan tiernos los quiero mucho...!

A mi querida tía Carmen Rosa y mi primo Iván por estar a mi lado en los momentos difíciles, brindándome su cariño y sus consejos para lograr todo lo que uno se propone.

A mi asesora Dra. Jacqueline Calla, una gran profesional, quien compartió sus conocimientos y me dio consejos que me ayudaron a concluir el presente trabajo. Sobre todo gracias por ese calor humano que me brindo en el laboratorio, usted es una gran persona. ¡Muchas Gracias!

A la Dra. Karina Delgado, por tomarse el tiempo en la revisión del presente trabajo, su apoyo incondicional y sobre todo por su amistad. ¡Gracias por todo!

Al Dr. Teddy Quispe y Dr. Efraín Salamanca por sus valiosos consejos y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mis queridos amigos Nolvyy, Uli, Irma, Nelly, Paula, Wendy, Carlita, Ruth, Ilse, Silvana, Nelita, Charito, Edith, Carlos, Josué, Ramí, Héctor y a todos por su cariño y apoyo incondicional. ¡Gracias por su Amistad!

Al instituto SELADIS, laboratorio de Inmunología, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de hacer realidad este sueño. Que fue mi segundo hogar, donde pase momentos alegres que nunca olvidare.

A todos los docentes del instituto SELADIS por ser parte de mi formación, por sus enseñanzas, su apoyo, confianza y sobre todo por su amistad.

A todos ellos: MUCHAS GRACIAS!!!!!!

## TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
1. INMUNIDAD INNATA.....	4
1.1 POLIMORFONUCLEARES Y MACRÓFAGOS.....	6
1.2 NATURAL KILLER.....	7
1.3 EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.....	7
2. INMUNIDAD ADQUIRIDA O ADAPTATIVA .....	10
2.1 RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO.....	10
2.2 ACTIVACIÓN LINFOCITARIA.....	11
2.3 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B.....	13
2.4 FASE EFECTORA O DE ELIMINACION DEL ANTIGENO.....	15
2.4.1 INMUNIDAD CELULAR.....	15
2.4.2 INMUNIDAD HUMORAL.....	16
3. NEUTROFILOS.....	18
3.1 CITOPLASMA DEL NEUTRÓFILO.....	20
3.1.1 GRÁNULOS PRIMARIOS AZURÓFILOS.....	20
3.1.2 GRÁNULOS SECUNDARIOS.....	21
3.1.3 GRÁNULOS TERCIARIOS.....	22
3.1.4 OTRAS MOLÉCULAS PRESENTES EN EL CITOPLASMA.....	22
3.2 MEMBRANA DEL NEUTRÓFILO.....	22
3.3 FISIOLÓGÍA DE LOS NEUTROFILOS.....	23
3.3.1 PROCESO DE EXTRAVASACIÓN Y MIGRACIÓN DEL NEUTROFILO.....	24
3.3.1.1 ADHESION Y RODAMIENTO DE LEUCOCITOS.....	24
3.3.1.2 ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA Y ADHESIÓN FIRME.....	24
3.3.1.3 EXTRAVASACIÓN Y MIGRACIÓN EN TEJIDOS.....	25
3.3.2 FAGOCITOSIS.....	26
3.3.2.1 RECONOCIMIENTO Y ADHESIÓN DE LA PARTÍCULA...26	
3.3.2.2 ENGLOBAMIENTO DE LA PARTÍCULA.....	27

3.3.2.3	DEGRADACIÓN Y DESTRUCCIÓN DE LA PARTÍCULA...	27
4.	LEISHMANIASIS.....	30
4.1	EPIDEMIOLOGÍA.....	30
4.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	31
4.3	EL VECTOR.....	32
4.4	RESERVORIO.....	33
4.5	CICLO BIOLÓGICO.....	33
4.6	MANIFESTACIONES CLINICAS.....	34
4.7	CLASIFICACIÓN.....	34
4.7.1	LEISHMANIASIS CUTÁNEA.....	35
4.7.2	LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA.....	35
4.7.3	LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA.....	36
4.7.4	LEISHMANIASIS VISCERAL.....	36
4.8	RESPUESTA INMUNE EN LEISHMANIASIS.....	36
4.8.1	RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS AL SITIO DE INFECCIÓN.....	37
4.8.2	FAGOCITOSIS Y PERMISIVIDAD DE LAS CÉLULAS.....	38
4.8.3	PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS Y ACTIVACION CELULAR....	40
4.8.4	CITOQUINAS.....	43
4.8.4.1	PROPIEDADES GENERALES.....	44
4.8.4.2	PRINCIPALES ACCIONES DE LAS CITOQUINAS.....	45
4.8.4.3	INTERLEUQUINA 1 (IL-1).....	46
4.8.4.4	INTERLEUCINA 8 (IL-8).....	49
4.8.4.5	CITOQUINAS EN LA LEISHMANIASIS.....	51
4.9	DIAGNOSTICO.....	52
4.10	TRATAMIENTO.....	52
5.	EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA.....	53
5.1	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	55
5.1.1	EXTRACCIÓN CONTINÚA.....	55
5.1.2	MACERACIÓN.....	56
5.1.3	OBTENCIÓN DE ALCALOIDES TOTALES.....	56
5.1.4	PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LA CORTEZA.....	56

5.1.5 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LAS HOJAS.....	57
III. ANTECEDENTES.....	58
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	67
V. JUSTIFICACIÓN.....	68
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	69
VII. OBJETIVOS.....	69
1. OBJETIVO GENERAL.....	69
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	69
VIII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	70
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	70
2. DESCRIPCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	70
3. CONTEXTO Y LUGAR.....	70
4. ASPECTOS ETICOS.....	70
IX. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	71
X. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
1. MATERIALES.....	71
2. REACTIVOS.....	72
3. EQUIPOS.....	72
4. PROCEDIMIENTOS.....	73
4.1 ADMINISTRACION DE EVANTA Y GLUCANTIME.....	73
4.2 AISLAMIENTO DE NEUTROFILOS INTRAPERITONEALES.....	74
4.3 VIABILIDAD Y AJUSTE CELULAR.....	74
4.4 CULTIVO CELULAR.....	75
4.5 PUREZA DE LAS CELULAS.....	75
4.6 FAGOCITOSIS A TRAVÉZ DE LA REDUCCIÓN DEL NAT.....	76
4.7 PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO CON EL REACTIVO DE GREISS.....	76
4.8 CUANTIFICACIÓN DE LA IL- $\alpha$ E IL-1 $\beta$ POR ELISA.....	77
4.9 CUANTIFICACIÓN DE LA IL-8 POR ELISA.....	77
5. ANALISIS ESTADISTICO.....	77
XI. RESULTADOS.....	78

1. EVALUACIÓN DE FAGOCITOSIS A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DEL NAT EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE.....	79
2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE.....	81
3. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\alpha$ EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE .....	82
4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE .....	84
5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-8 EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE .....	85
XII. DISCUSIÓN.....	87
XIII. CONCLUSIONES.....	91
V. RECOMENDACIONES.....	91
XV. BIBLIOGRAFIA.....	92
XVI. ANEXOS.....	100

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Células efectoras y componentes del sistema inmune innato.....	9
Figura 2 Inmunidad Celular y Humoral.....	17
Figura 3 Las células del sistema inmune provienen de células pluripotentes.....	18
Figura 4 Maduración de los neutrófilos.....	19
Figura 5 Proceso de Migración del Neutrófilo del torrente sanguíneo.....	26
Figura 6 Mecanismos microbicidas del fagocito.....	29
Figura 7 <i>Lutzomyia longipalpis</i> en América.....	32
Figura 8 <i>Phlebotomus sp.</i> Viejo Mundo.....	32
Figura 9 Ciclo Biológico de la <i>Leishmania spp.</i> .....	34
Figura 10 Interacción entre neutrófilos y parásitos de <i>Leishmania</i> .....	40
Figura 11 Interacción entre macrófagos y parásitos de <i>Leishmania</i> .....	42
Figura 12 Modo de acción de las citoquinas.....	44
Figura 13 Acción de las citoquinas sobre las células.....	45
Figura 14 Cromosoma 2.....	47
Figura 15 Acciones Biológicas de la IL-1 sobre diferentes órganos del cuerpo.....	48
Figura 16 Interleuquina 8.....	50
Figura 17 Interleuquinas en la reacción inmunitaria a <i>Leishmania</i> .....	51
Figura 18 <i>Galipea longiflora Krause</i> .....	55
Figura 19 Administración de Evanta por vía oral a ratones de la cepa Balb/c de los grupos de estudio.....	73
Figura 20 Administración de Glucantime por vía intraperitoneal a ratones de la cepa Balb/c del grupo de estudio.....	73
Figura 21 Neutrófilos peritoneales, observación al microscopio.....	78
Figura 22 Células Fagocíticas, observación al microscopio.....	79
Figura 23 Efecto del EAE sobre la fagocitosis en Neutrófilos murinos.....	80
Figura 24 Efecto del EAE sobre la producción del NO en Neutrófilos murinos.....	81
Figura 25 Efecto del EAE sobre la producción de IL- 1 $\alpha$ en Neutrófilos murinos...83	
Figura 26 Efecto del EAE sobre la producción de IL- 1 $\beta$ en Neutrófilos murinos...84	
Figura 27 Efecto del EAE sobre la producción de IL- 8 en Neutrófilos murinos....86	

## INDICE TABLAS

Tabla N° 1 Características del Sistema Inmune.....	3
Tabla N° 2 Componentes del Sistema Inmune Innato.....	5
Tabla N° 3 Clasificación taxonómica de <i>Galipea longiflora</i> .....	53
Tabla N° 4 Rendimientos y actividad leishmanicida <i>In vitro</i> de alcaloides quinolínicos aislados de corteza del tronco, hojas, corteza y raíz de <i>Galipea longiflora</i> .....	57

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1 Buffer Phosphate Krebs-Ringer (KRG).....	100
ANEXO N° 2 Colorante azul tripan.....	100
ANEXO N° 3 Medio RPMI.....	101
ANEXO N° 4 Tinción Wright-Giemsa.....	101
ANEXO N° 5 Nitroazul de Tetrazolio.....	101
ANEXO N° 6 Reactivo de Greiss.....	102
ANEXO N° 7 Interleuquina 1 alfa y beta.....	102
ANEXO N° 8 Interleuquina 8.....	103

## RESUMEN

El uso de las plantas medicinales está siendo ampliamente estudiado en todo el mundo, por las bondades que presenta en la cura de diferentes enfermedades, promoviéndolo como un potencial candidato en la fabricación de medicamentos.

Una de las enfermedades que cobra vidas cada año es la leishmaniasis, pues alrededor de 12 millones de personas están afectadas en todo el mundo. En Bolivia está presente principalmente en La Paz, Beni, Pando y Cochabamba. El tratamiento, se realiza principalmente con glucantime, anfotericina-B y pentamidina. Actualmente se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de la planta *Galipea longiflora* sobre linfocitos, células dendríticas y macrófagos. Sin embargo no se han realizado estudios sobre aquellas células que son las primeras que entran en contacto con el parásito, como ser los neutrófilos.

En el presente estudio evaluamos el efecto del extracto de alcaloides de Evanta (EAE) sobre la actividad de los neutrófilos en modelo murino.

El estudio se realizó en neutrófilos peritoneales de ratones Balb/c, tratados con EAE a dos dosis o con Glucantime. Se evaluó la fagocitosis a través de la reducción del NAT y producción de Óxido Nítrico, así como la producción de citoquinas por éstas células.

Se observó que el EAE disminuye el porcentaje de células fagocíticas capaces de reducir el NAT y disminuye la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, ( $p < 0,05\%$ ), de forma dosis-dependiente. No se observó ningún efecto sobre la producción del óxido nítrico.

En conclusión la Evanta disminuye la producción de estas citoquinas pro-inflamatorias, que podría contribuir a un mejor control de la inflamación aguda. No afecta a la producción del óxido nítrico, que es el principal mecanismo microbicida contra la leishmaniasis. Resultados que muestran el efecto inmunomodulador de la Evanta apoyando a aquellos estudios donde la actividad de control de la leishmaniasis no solo se debe a su acción directa sobre el parásito sino también a su acción sobre la respuesta inmune. Considerándola como una buena alternativa en el tratamiento de los pacientes infectados con leishmaniasis.

## I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas, producidas por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*. La enfermedad es transmitida por insectos dípteros hematófagos, que corresponden a diferentes especies del género *Flebótomos* o *Lutzomyias*, siendo los reservorios animales vertebrados. Se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped. <sup>(1)(2)</sup>

Según las manifestaciones clínicas; se presenta en cuatro formas diferentes: leishmaniasis visceral, leishmaniasis mucocutánea (inflamación de mucosa destructiva), leishmaniasis cutánea (lesiones ulcerosas de la piel), y la leishmaniasis cutánea difusa. <sup>(1)(2)(3)</sup>

La infección por leishmaniasis generalmente induce una respuesta inmune que depende de ciertos factores:

- Forma clínica de la enfermedad
- Especie de *Leishmania* involucrado
- Cronicidad de la enfermedad

Los componentes principales de la respuesta inmune son: neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, células T CD4+ y CD8+; citoquinas, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y el sistema del complemento. <sup>(4)</sup>

Aunque numerosos estudios muestran que el control de la leishmaniasis depende de la respuesta de los linfocitos T que se establece después de la primera semana de la infección, la tendencia actual es conceder igual importancia a las células de la respuesta inmune innata, al ser ellas las primeras que entran en contacto con el parásito. <sup>(4)</sup>

Siendo los neutrófilos, las primeras células atraídas al sitio de infección, migran e inician sus funciones liberando sustancias, fagocitando o destruyendo microorganismos, o modificando la respuesta de células vecinas a través de la producción de citoquinas, además de participar en el inicio del proceso inflamatorio. <sup>(4)</sup>

La leishmaniasis es una enfermedad causante de una mortalidad considerable a nivel mundial, afectando a millones de personas cada año. Se cree que alrededor del mundo hay 12 millones de personas afectadas; con 1,5 - 2 millones de nuevos casos cada año. <sup>(1)(2)</sup>

En Bolivia aproximadamente 800000 individuos se encuentran en alto riesgo de infectarse. En el año 2007 se registraron 3153 casos: de los cuales 1753 casos corresponden al departamento de La Paz, seguido por Beni, Pando, Cochabamba y Santa Cruz. <sup>(2)</sup>

Actualmente el tratamiento para la leishmaniasis está basado en compuestos antimoniales pentavalentes. Sin embargo, estos son altamente tóxicos, difíciles de administrar, requieren de un control clínico cercano, y son de un elevado costo. Además, la creciente frecuencia de casos de resistencia química muestra claramente la necesidad de encontrar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de leishmaniasis. Estudios basados en el uso de productos naturales; como ser la *Galipea longiflora* (Evanta); que está siendo utilizada en determinados regiones de Bolivia para el tratamiento de la leishmaniasis y otras enfermedades parasitarias han mostrado interesantes efectos sobre la respuesta inmune. <sup>(5)(6)</sup>

En este sentido; el presente trabajo tiene por objeto Evaluar *In vivo* el efecto del extracto total de alcaloides de Evanta sobre la actividad de los neutrófilos en modelo murino.

## II. MARCO TEORICO

El sistema inmune tiene un rol fundamental en la defensa contra infecciones puede subdividirse en inmunidad innata y adquirida.

La inmunidad innata, existe en todos los seres multicelulares, y sirve como primera línea de defensa contra microorganismos. <sup>(7)</sup>

La inmunidad adquirida o adaptativa, aparece más tardíamente, es un sistema más complejo que puede reconocer a cualquier otra partícula que le resulte extraña, y aprende de esta experiencia, guardando una memoria de lo que ha reconocido. Esta memoria hace que el repertorio inmunológico de un adulto sea distinto al de un niño. El adulto tendrá células de memoria de los reconocimientos antigénicos previos y tendrá moléculas de alta afinidad para ellos. Ante una amenaza microbiana, el sistema inmune innato es el primero en la contención, y cuando es sobrepasado se pone en marcha el sistema inmune adaptativo. <sup>(7)</sup>

**Tabla N° 1**  
**Características del Sistema Inmune**

	<b>Innato</b>	<b>Adquirido</b>
<b>Especificidad</b>	Por estructuras compartidas por grupos de microbios	Por antígenos de microbios y otros antígenos no microbianos
<b>Diversidad</b>	Limitada, codificada por genes de línea germinal	Extensa, receptores específicos codificados por recombinación genética
<b>Memoria</b>	No	Si
<b>Autorreactividad</b>	No	No en condiciones normales
<b>Componentes celulares</b>	Polimorfonucleares y células NK	Linfocitos
<b>Componentes solubles</b>	Complemento, opsoninas, citoquinas	Anticuerpos, citoquinas

Fuente: Rev. Reumatología 2005; 21(2): 51-57.

## 1. INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra numerosos microorganismos, siendo esencial para el control de abundantes infecciones bacterianas. Las células de este sistema desempeñan un papel esencial en el inicio y subsiguiente dirección de la respuesta inmune adaptativa; pues existe un retraso de 4 a 7 días antes de que la respuesta inmune adaptativa primaria se ejecute; por lo cual la respuesta inmune innata desempeña una función crucial para controlar la infección durante dicho periodo. <sup>(7)(8)</sup>

El sistema inmune innato está compuesto de:

- **Barreras físicas y químicas:** como los epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en su superficie.
- **Células efectoras:** neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y células asesinas naturales (NK).
- **Proteínas sanguíneas:** el complemento y otros mediadores de inflamación
- **Citoquinas**

Los componentes del sistema inmune innato reconocen estructuras características de patógenos microbianos, llamados “patrones moleculares” y se unen a “receptores de reconocimiento de patrón”. Por ejemplo los Virus, Bacterias Gram positivas (+), Gram negativas (-) y Hongos que expresan distintos patrones moleculares, algunos son RNA de doble cadena en virus, secuencia de DNA no metiladas, proteínas bacterianas como N-formil-metionina, lípidos y carbohidratos complejos propios de bacterias, lipopolisacáridos (LPS) de Bacterias Gram (-), ácido teicoico de Gram (+), y oligosacáridos ricos en manosa entre otros. <sup>(7)(8)</sup>

Este sistema, es también capaz de discriminar entre lo propio y lo extraño. Los receptores de reconocimiento de patrón son codificados por genes de línea germinal (sin rearrreglos génicos) y su capacidad de reconocimiento es limitada (calculada en 1.000 patrones moleculares). <sup>(7)(8)</sup>

Los epitelios tienen una función importante, además de ofrecer una barrera continua que protege del medio externo, secretan péptidos con actividad antimicrobiana. Las defensinas en la piel tienen capacidad de eliminar bacterias y

hongos, y la criptocidina en el intestino es capaz de esterilizar el lumen de las criptas. Algunas células como los queratinocitos pueden secretar citoquinas. Hay otros elementos celulares como linfocitos intraepiteliales y linfocitos denominados  $\beta$ -1 en las cavidades serosas, que reconocen y responden a microbios. Las células  $\beta$ -1 tienen receptores de inmunoglobulinas a semejanza de linfocitos B de la inmunidad adaptativa, pero estos receptores tienen poca diversidad; reconocen principalmente polisacáridos y antígenos lipídicos de bacterias presentes frecuentemente en los intestinos. Son anticuerpos clase IgM llamados anticuerpos naturales, que están preformados y, por lo tanto, útiles en la defensa a microbios que logran traspasar la barrera epitelial intestinal. <sup>(7)(8)</sup>

**Tabla N° 2**

**Componentes del Sistema Inmune Innato**

<p><b>Barreras:</b> Epitelios Defensinas Linfocitos intraepiteliales</p>	<p>Impiden entrada de microbios Eliminación de microbios Eliminación de microbios</p>
<p><b>Células efectoras:</b> Neutrófilos Macrófagos  Células NK</p>	<p>Fagocitosis y eliminación de microbios Fagocitosis, eliminación de microbios, secreción de citoquinas Lisis de células infectadas, activación de macrófagos</p>
<p><b>Proteínas:</b> Complemento  Lectina que une manosa  Proteína C reactiva</p>	<p>Lisis y/u opsonificación de microbios, activación de leucocitos Opsonificación, activación del complemento (vía de las lectinas) Opsonificación, activación de complemento</p>
<p><b>Citoquinas:</b> TNF, IL-1, quimioquinas Interferón <math>\alpha</math> y <math>\beta</math> Interferón <math>\gamma</math> IL-12  IL-15</p>	<p>Inflamación Resistencia antiviral Activación de macrófagos Estimula la diferenciación a Th1, producción de INF<math>\gamma</math> por NK y LT Proliferación de NK</p>

Fuente: Rev. Reumatología 2005; 21(2): 51-57.

Las células efectoras que componen el sistema inmunitario innato son: los polimorfonucleares (PMN), mastocitos y células NK, además del sistema de complemento. <sup>(8)(9)</sup>

### **1.1 POLIMORFONUCLEARES Y MACRÓFAGOS**

Son capaces de identificar, ingerir y eliminar al agente patógeno; existen macrófagos residentes en distintos tejidos, estratégicamente colocados en las puertas de entrada a nuestro organismo. Los neutrófilos y monocitos en circulación son atraídos a los tejidos a las pocas horas de una invasión bacteriana, ahí los monocitos se transforman en macrófagos con capacidad fagocítica. El reclutamiento de estas células desde la circulación se debe a la acción de citoquinas producidas por macrófagos tisulares que han reconocido al agente patógeno. Entre ellas destacan la interleuquina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF) y quimioquinas; las dos primeras inducen la expresión de diversas moléculas de adhesión en el endotelio (selectina E, VCAM-1, ICAM-1) que son reconocidas por los leucocitos gracias a distintos receptores (ligando de selectina e integrinas VLA-4, LFA-1, MAC-1). La interleuquina 8 (IL-8) estimula la migración de leucocitos PMN a través del endotelio y por gradiente de concentración de ésta son dirigidos al sitio de la infección. <sup>(8)(9)</sup>

Los PMN y macrófagos reclutados poseen diversos receptores que les permiten reconocer microbios e ingerirlos; entre ellos están los receptores para manosa, integrinas y opsoninas, como la fracción C3 del complemento, fibrinógeno, fibronectina y proteína C reactiva. Los receptores tipo toll que reconocen patrones moleculares en microbios, también pueden activar al fagocito por estar asociados a kinasas intracelulares y que transmiten señales de activación. Existen otros receptores acoplados a proteína G que permiten reconocer residuos proteicos microbianos, responder a quimioquinas, reconocer a productos del complemento (C5a) y mediadores lipídicos de la inflamación, como prostaglandinas y leucotrienos. De esta manera el fagocito, en el sitio de infección, adquiere toda la capacidad para comportarse en forma eficiente en la eliminación del agente patógeno. <sup>(8)(9)</sup>

Los fagocitos internalizan a microbios en vacuolas llamadas fagosomas. Estas se fusionan con lisosomas formando los fagolisosomas, donde transcurre la actividad microbicida. Esta involucra la acción de enzimas proteolíticas y la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (EROS). Los fagocitos activados producen citoquinas que aumentan el fenómeno inflamatorio (IL-1, TNF y quimioquinas), interleuquina 12 (IL-12), que estimula células NK, y a linfocitos T para la producción de interferón (IFN- $\gamma$ ), factores de crecimiento para fibroblastos y células endoteliales que participan en la remodelación del tejido después del daño. Este fagocito de la inmunidad innata puede expresar y presentar péptidos generados de la digestión de proteínas microbianas a linfocitos T e iniciar la respuesta inmune adaptativa. <sup>(8)(9)</sup>

## **1.2 NATURAL KILLER**

Estas células eliminan a las células infectadas con virus y otros microorganismos intracelulares; también, a células que han perdido la expresión de moléculas de histocompatibilidad MHC-I, como las tumorales. Morfológicamente son linfocitos grandes granulares y se encuentran en entre un 5%-20% en circulación y en el bazo; son activados por la IL-15, IL-12 e interferón tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) producidos por el macrófago en respuesta a la infección. Las NK activadas producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , que aumenta la activación en macrófagos de la inmunidad innata. Además tiene receptores para la fracción Fc, de baja afinidad para el Fc de la inmunoglobulina (IgG1) e inmunoglobulina (IgG3), lo que les permite ejercer la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), durante la respuesta inmune adaptativa. <sup>(8)(9)</sup>

## **1.3 EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO**

En la inmunidad innata, el sistema de complemento puede ser activado por la vía alterna (directamente por los microorganismos) y por la vía de las lectinas. La lectina es una proteína plasmática que se une a residuos de manosa y que la reconoce en glicolípidos y glicoproteínas de origen microbiano. La activación del complemento genera opsoninas como C3b y otras proteínas como C3a y C5a, que

son quimiotácticas para neutrófilos y los atraen al sitio de la infección. La activación de los componentes tardíos del complemento genera el llamado complejo de ataque a membrana (C6-C7-C8-C9), que produce la lisis de la célula donde el complemento se ha depositado. Durante la inmunidad innata también se producen señales solubles de comunicación intercelular llamadas citoquinas, que son producidas por macrófagos, neutrófilos y células NK. <sup>(8)(9)</sup>

Entre ellas están los interferones tipo I, que controlan las infecciones virales; el TNF, la IL-1 y quimioquinas, que median la inflamación; la IL-15 e IL-12, que promueven la expansión y actividad de células NK; IFN- $\gamma$ , que activa macrófagos; IL-10, que limita activación de macrófagos; e IL-6, que aumenta la producción de neutrófilos desde la médula ósea y aumenta reactivantes de fase aguda, como la proteína C reactiva. La inflamación generada por la inmunidad innata, si es severa, puede producir signos sistémicos, como la reacción de fase aguda o el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, lo que se debe a la acción a distancia que pueden ejercer estas citoquinas. <sup>(7)(8)(9)</sup>

En si en la inmunidad innata, los microorganismos que logran traspasar las barreras epiteliales y entrar en los tejidos son fagocitados por macrófagos residentes tisulares. Estas células secretan citoquinas que activan el endotelio, y permiten reclutar otras células con capacidad fagocítica, como los PMN. Se genera el fenómeno inflamatorio que es la consecuencia del reclutamiento de leucocitos y extravasación de proteínas plasmáticas al sitio de la infección. Si el agente microbiano entra por vía sanguínea, el sistema de la inmunidad innata dispone de distintas proteínas plasmáticas que entran en juego, como el sistema del complemento. <sup>(8)(9)</sup>

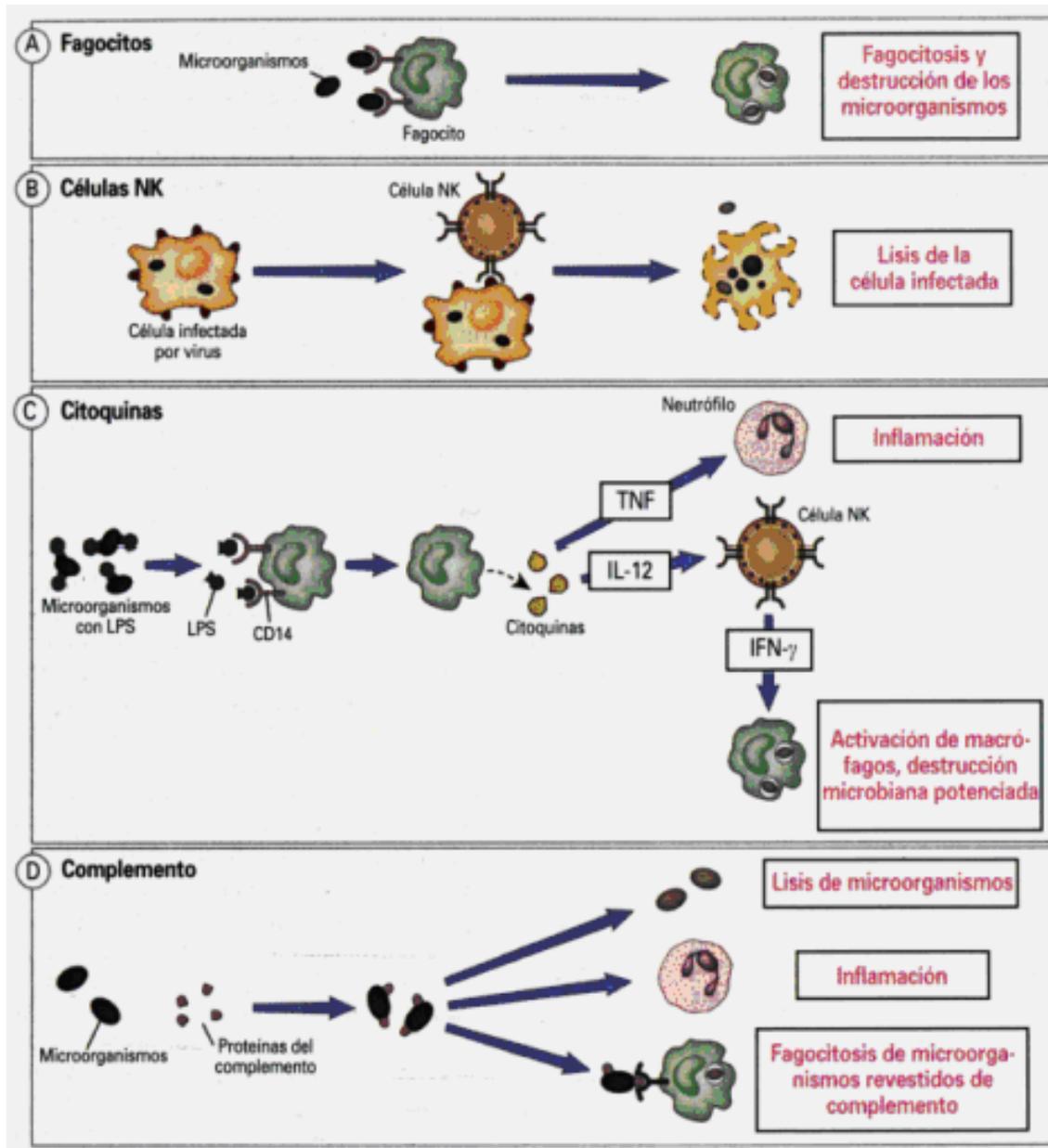


Fig. 1 Células efectoras y componentes del sistema inmune innato

Fuente: Brandan Nora, 2007.

## **2. INMUNIDAD ADQUIRIDA O ADAPTATIVA**

Los linfocitos son las células específicas de este sistema; los linfocitos T son formados en el timo y están a cargo de la respuesta inmune celular, y los linfocitos B están formados en la médula ósea y están a cargo de la respuesta inmune humoral (anticuerpos). <sup>(7)(8)(9)</sup>

La presentación antigénica y la activación linfocitaria, es decir, las fases iniciales de la respuesta inmune adaptativa, se llevan a cabo en el tejido linfoide periférico, como los ganglios y bazo, ya que se encuentran en ellos las condiciones adecuadas de cercanía de los elementos celulares que intervienen en esta respuesta. La fase efectora o de eliminación de antígeno se ejerce en los sitios de infección. <sup>(8)(9)</sup>

### **2.1 RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO**

Poseemos numerosos clones de linfocitos, definiendo clon como célula que proviene de un mismo progenitor y, al igual que su antecesor, puede reconocer al mismo determinante del antígeno, por portar el mismo receptor. El receptor específico para los linfocitos T es TCR (reconoce sólo antígenos proteicos) y, para linfocitos B es BCR. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen secuencias lineales de 7-10 aminoácidos y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> pueden reconocer secuencias de hasta 30 aminoácidos en una molécula peptídica. Para reconocer estas secuencias, la sustancia antigénica debe ser degradada, procesada y ser expuesta en la membrana celular en conjunto con moléculas de histocompatibilidad. Las células presentadoras de antígeno (APC) están en todos los tejidos, principalmente en las vías de entrada al organismo, como piel, tejido respiratorio y tracto digestivo. Las APC por excelencia son: las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B que también pueden presentar antígenos a linfocitos T. Existen dos formas de presentación antigénica: <sup>(7)(8)(9)</sup>

- La vía endosómica o vía MHC clase II: donde los antígenos extracelulares son endocitados y degradados en vesículas de endosomas y lisosomas; el péptido degradado se une a moléculas de histocompatibilidad clase II, y ambos son transportados y expuestos en la membrana de la APC. Presentando los péptidos al linfocito T CD4+, que reconoce tanto al péptido como secuencia del antígeno clase II, usando su TCR. <sup>(7)(8)(9)</sup>
- La vía citosólica o vía MHC Clase I: procesa antígenos presentes en el citosol (síntesis endógena); éstos son degradados por proteosomas en péptidos que se unen a moléculas de histocompatibilidad clase I, y son transportados y expuestos en la membrana de la APC, para ser reconocidos por el TCR del linfocito T CD8+. El reconocimiento de moléculas de lo propio (de antígenos de histocompatibilidad) es llamado fenómeno de restricción génica y deja en evidencia que los linfocitos T sólo pueden reconocer a antígenos asociados a membranas y que éstos pueden proceder de distintos sitios del organismo, extra o intracelular. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Los linfocitos B pueden reconocer a distintos antígenos, proteicos o no, como ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y sustancias químicas. Reconocen la forma tridimensional del antígeno, en forma soluble en los líquidos corporales o adosados a membranas. El BCR está formado por una inmunoglobulina de membrana clase IgM o IgD en células vírgenes; que están unidas en forma no covalente con moléculas correceptoras Ig- $\alpha$  e Ig- $\beta$  encargadas de la transmisión de señal al intracelular. <sup>(7)(8)(9)</sup>

## 2.2 ACTIVACIÓN LINFOCITARIA

Los linfocitos que están en circulación, entrando y saliendo de órganos linfoides periféricos (recirculación linfocitaria), lo hacen en un estado de reposo de su ciclo celular. Al encontrarse con una APC en órganos linfoides periféricos, estas les presentan al antígeno que es reconocido por su receptor específico y comienza la fase de activación. Se inicia una serie de fenómenos que van desde la salida del

estado de reposo del ciclo celular, la entrada en fase proliferativa o de expansión clonal, síntesis de citoquinas y de receptores de citoquinas, diferenciación a células efectoras y de memoria. La activación linfocitaria requiere de dos señales. En los linfocitos T la primera señal está dada por el reconocimiento del determinante antigénico/antígeno de histocompatibilidad por el receptor TCR y a los correceptores CD4 o CD8, la segunda señal por el reconocimiento de moléculas coestimuladoras. La más conocida es la molécula CD28 en linfocitos T que se une a las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas en APC activadas. El CD28 transmite señales al linfocito T que estimulan su respuesta al antígeno, la producción de citoquinas como la IL-2 y la diferenciación del linfocito T virgen a linfocito T efector y células de memoria. Hay otras familias de receptores y ligandos que pueden estimular o inhibir a linfocitos T. Es importante nombrar a CTLA-4 (CD152) que es homóloga de CD28, ya que une a B7-1 y B7-2 en APC, pero que funciona como una señal de inhibición de la respuesta T. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Las respuestas más tempranas de la activación linfocitaria son la secreción de citoquinas y la expresión de nuevas moléculas de superficie en linfocitos T, por lo que se denominan marcadores de activación, como la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 o CD25. Según las condiciones de activación, los linfocitos T vírgenes estimulados por antígenos se diferencian en subpoblaciones que secretan un perfil característico de citoquinas y ejercen distintas funciones. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Hay dos poblaciones claramente distintas Th1 y Th2. La presencia de IL-12, secretada por la APC, estimula la respuesta celular Th1, productora de IFN- $\gamma$ . El grupo Th2 se estimula por la presencia de IL-4 y secreta en forma característica IL-4 e IL-5. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Cada subpoblación se amplifica a sí misma e inhibe a la otra, es decir: el IFN- $\gamma$  secretado por Th1 promueve diferenciación o amplifica respuestas Th1 e inhibe la proliferación de Th2, la IL-4 producida por Th2 promueve la diferenciación de Th2 y la IL-10 (producida por Th2 y otras células) inhibe activación de Th1. Por eso las respuestas inmunes tienden a polarizarse a Th1 o Th2. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Las respuestas Th1 son provocadas en respuesta a microorganismos que infectan o activan a macrófagos o que activan NK. Gérmenes intracelulares, virus y antígenos proteicos administrados con adyuvantes son los principales estimulantes de respuestas Th1, teniendo en común todos ellos la capacidad de provocar respuestas innatas de importancia con producción de IL-12. La principal función efectora del linfocito Th1 con la producción de IFN- $\gamma$  es la estimulación del macrófago para promover la destrucción de bacterias intracelulares, pero también estimular la producción de anticuerpos con capacidad opsónica y de activar el complemento, proceso que también permite una mayor capacidad fagocítica. <sup>(7)(8)</sup>

La diferenciación a Th2 ocurre en respuesta a infección por helmintos y a la exposición a alérgenos; ambas situaciones producen estimulación crónica de linfocitos T y poca respuesta de la inmunidad innata o de macrófagos activados. La principal respuesta efectora Th2 son las reacciones inmunes mediadas por basófilos y eosinófilos y la producción de IgE; intervienen en ellas las citoquinas IL-4, IL-5 y IL-13. Otras citoquinas producidas por Th2, como la IL-4, IL-13 y IL-10, antagonizan e inhiben la activación del macrófago estimulada por IFN- $\gamma$ . La respuesta de anticuerpos mediada por Th2 no estimula la fagocitosis ni activa en forma eficiente al complemento. <sup>(7)(8)</sup>

Los linfocitos T vírgenes con marcación CD8<sup>+</sup>, que reconocen moléculas clase I, se diferencian en linfocitos T citotóxicos (LTc), para esta diferenciación se requiere citoquinas como la IL-2. Este linfocito puede reconocer y eliminar a células propias que expresen antígenos peptídicos extraños o propios modificados en asociación con moléculas clase I. <sup>(7)(8)</sup>

### **2.3 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B**

Incluyen respuestas que llevan a la proliferación y expansión de clones específicos para el antígeno reconocido por el BCR, la transformación en células plasmáticas que secretan los anticuerpos y la formación de células de memoria. La respuesta de anticuerpos para antígenos proteicos necesita la cooperación de linfocitos T, es llamada T dependiente. La respuesta a antígenos no proteicos como polisacáridos y lípidos es T independiente. <sup>(7)(8)(9)</sup>

La primera señal en la activación del linfocito B es el reconocimiento del antígeno por el complejo receptor BCR y la segunda señal está dada por el reconocimiento de la molécula del complemento C3d (fragmento de degradación de C3b), que está unida al complejo inmune o al microorganismo que ha activado el complemento por la vía alterna o la vía de las lectinas. El C3d es reconocido por el receptor de complemento tipo 2 (CR2 o CD21), que se expresa en linfocitos B maduros en asociación con otras moléculas, como el CD19 y CD81, formando con ellas un complejo de correceptor cuya función es completar la activación ya iniciada por el BCR. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Los linfocitos B al reconocer antígeno y activarse salen de su estado de reposo y entran en ciclo celular, aumentan su tamaño celular, su contenido de RNA y sus organelos, como los ribosomas. Los linfocitos B activados aumentan su expresión de moléculas HLA II y moléculas coestimuladoras, como B7-2 (CD86) y B7-1 (CD80), por lo que adquieren la capacidad de comportarse como eficientes células presentadoras de antígenos para linfocitos T. También aumenta su expresión de receptores para citoquinas, por lo que responden más eficientemente a la ayuda de linfocitos T y cambian su patrón de expresión de quimioquinas, por lo que pueden migrar e interactuar con otras células. <sup>(7)(8)(9)</sup>

Los antígenos T independientes, generalmente polímeros con múltiples determinantes idénticos, producen un entrecruzamiento eficiente de los BCR para generar una adecuada respuesta de anticuerpos. Generalmente son anticuerpos de baja afinidad y principalmente de la clase IgM y muy poco IgG, como la respuesta de IgG2 para el polisacárido capsular del neumococo. No ocurre lo mismo para antígenos proteicos que expresan una copia del epítipo por proteína en su conformación nativa, por lo que requieren de ayuda T (respuesta T dependiente) para inducir una respuesta de anticuerpos. Esta respuesta requiere activación por el antígeno proteico de linfocitos B y linfocitos T, contacto físico entre estas dos células, presentación antigénica por el linfocito B al linfocito T específico, expresión de moléculas de membrana (CD40 ligando en linfocito T que se une a CD40 en linfocito B) y secreción de linfoquinas por linfocitos T que se

unen y activan al linfocito B, favoreciendo su transformación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las citoquinas secretadas (IL-2, IL-4, IL-6) también van a estimular la síntesis y secreción de anticuerpos y a promover el cambio de isotipo de anticuerpos secretado. La IL-4 favorece la síntesis de IgE, el IFN- $\gamma$  estimula síntesis de anticuerpos fijadores de complemento, el factor transformador del crecimiento (TGF- $\beta$ ) favorece producción de IgA. Otro proceso propio de respuesta de anticuerpos T dependientes es la maduración de afinidad que ocurre a medida que avanza la respuesta humoral y se debe a la mayor sobrevivencia de aquellos linfocitos B que producen anticuerpos de más alta afinidad (esta respuesta deja una memoria de larga data). <sup>(7)(8)(9)</sup>

La primera exposición al antígeno conduce a la activación de linfocitos B vírgenes y su diferenciación en células plasmáticas y de memoria, es llamada respuesta inmune primaria y se caracteriza por la producción principalmente de IgM. Producto de esta respuesta se forman células plasmáticas que sobreviven por largos períodos de tiempo en la médula ósea y que continúan produciendo anticuerpos; también se producen linfocitos B de memoria. En la respuesta inmune secundaria (segunda exposición) se estimulan estas células de memoria, lo que da una respuesta de anticuerpos más rápida y de mayor magnitud, en donde predominan otros isotipos como el IgG. <sup>(7)(8)(9)</sup>

## **2.4 FASE EFECTORA O DE ELIMINACIÓN DEL ANTÍGENO**

Esta fase se lleva a cabo, mediante la inmunidad celular y la inmunidad humoral, detalladas a continuación.

### **2.4.1 INMUNIDAD CELULAR**

Esta dada por los linfocitos T y sirve como mecanismo de defensa contra microorganismos que viven dentro de fagocitos o que infectan células no fagocíticas. Para gérmenes intracelulares, la inmunidad celular estimula las funciones microbicidas de los fagocitos para que ellos puedan eliminar a los gérmenes. Influenciada por el IFN- $\gamma$  producido por Th1 y linfocitos T CD8. Los

linfocitos T también producen TNF y linfoxina que estimulan el reclutamiento de leucocitos y la inflamación. La inflamación por activación de macrófagos dependiente de linfocitos T puede provocar daño tisular, lo que se conoce como hipersensibilidad retardada. <sup>(8)(9)(10)</sup>

Los linfocitos T CD8+ o citotóxicos son los encargados de eliminar a microorganismos que infectan o se replican en el citoplasma de distintos tipos celulares. Estos linfocitos eliminan células infectadas y que expresan péptidos en asociación con moléculas HLA clase I. Esto lo logra por exocitosis de sus gránulos, principalmente perforina, que hacen poros en la membrana de las células blanco, lo que permite la entrada de otras moléculas que inducen apoptosis en la célula a eliminar. <sup>(8)(9)(10)</sup>

#### **2.4.2 INMUNIDAD HUMORAL**

Es mediada por anticuerpos, y su función es la defensa contra microorganismos extracelulares y toxinas bacterianas. Su eliminación requiere la participación de otros sistemas de la inmunidad innata, como el complemento y fagocitos. Los anticuerpos producidos por linfocitos B y células plasmáticas en órganos linfoides secundarios y médula ósea entran a la circulación y pueden llegar a cualquier tejido. Algunos de ellos están presentes en las mucosas IgA y pueden cruzar la placenta IgG. <sup>(8)(9)(10)</sup>

Los diferentes isotipos de anticuerpos tienen distintas funciones, y esto es mediado por la fracción Fc del anticuerpo. Todas estas funciones son iniciadas una vez que el anticuerpo se une a su antígeno por su fragmento variable (Fab). Entre las funciones efectoras de anticuerpos está la inhibición de la infectividad de microorganismos al unirse a ellos e impedir su unión a receptores específicos en la superficie celular; y la neutralización de toxinas, ambas funciones dependientes de Fab e independientes del isotipo del anticuerpo. <sup>(8)(9)(10)</sup>

Las funciones efectoras dependientes de Fc son la opsonificación y posterior fagocitosis, lisis celular por activación del complemento y la ADCC mediada por NK y otros leucocitos. <sup>(7)(8)(9)(10)</sup>

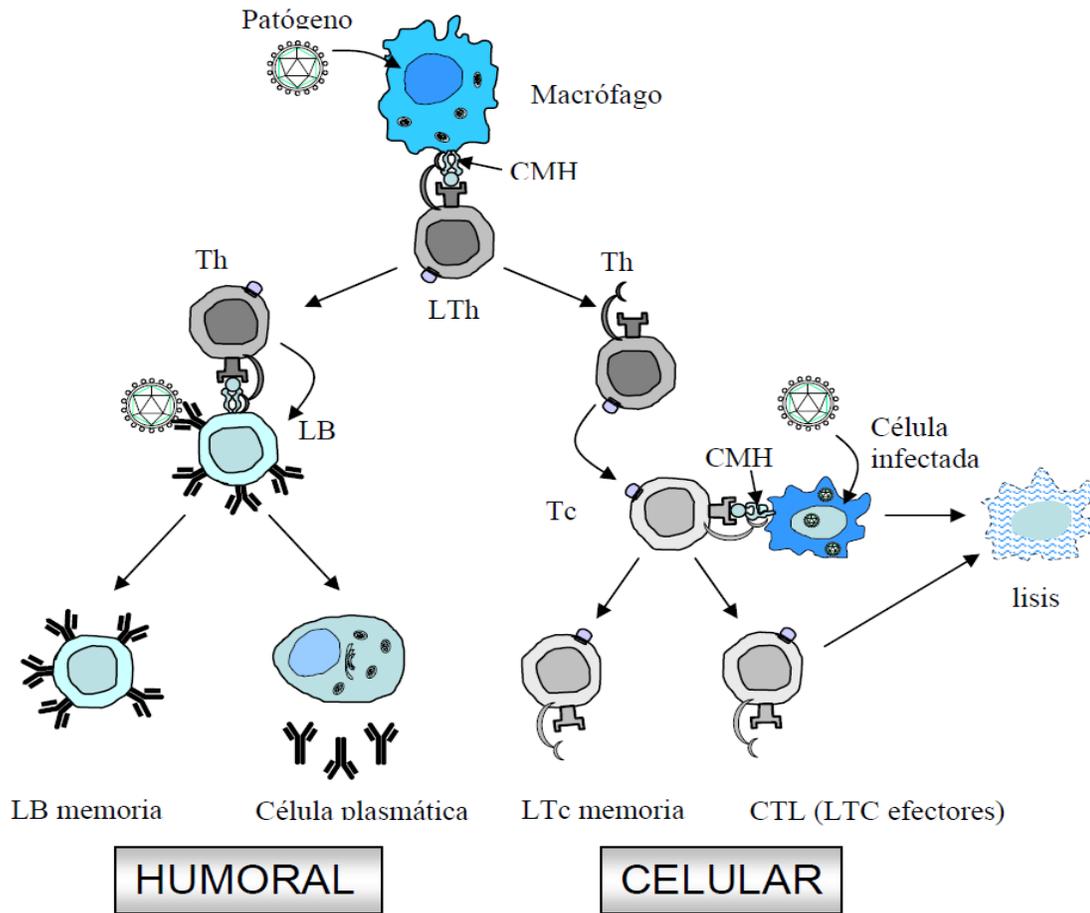


Fig. 2 Inmunidad Celular y Humoral

Brandan Nora, 2007

### 3. NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos derivan de células madre pluripotenciales localizadas en la médula ósea, constituyen junto con los basófilos y los eosinófilos la denominada serie granulocítica, un grupo celular con núcleos multilobulados, numerosos gránulos citoplasmáticos de tinción característica y un lugar de acción tisular específico. El desarrollo de los granulocitos en la médula ósea atraviesa dos fases bien diferenciadas, una mitótica y otra no mitótica. Cada fase dura aproximadamente una semana. En la mitótica las células maduran de mieloblastos a promielocitos y mielocitos, coincidiendo con la aparición de los gránulos citoplasmáticos característicos. En la fase no mitótica se desarrollan progresivamente los metamielocitos, los neutrófilos en cayado o inmaduros y finalmente los neutrófilos maduros. <sup>(11)(12)(13)(14)</sup>

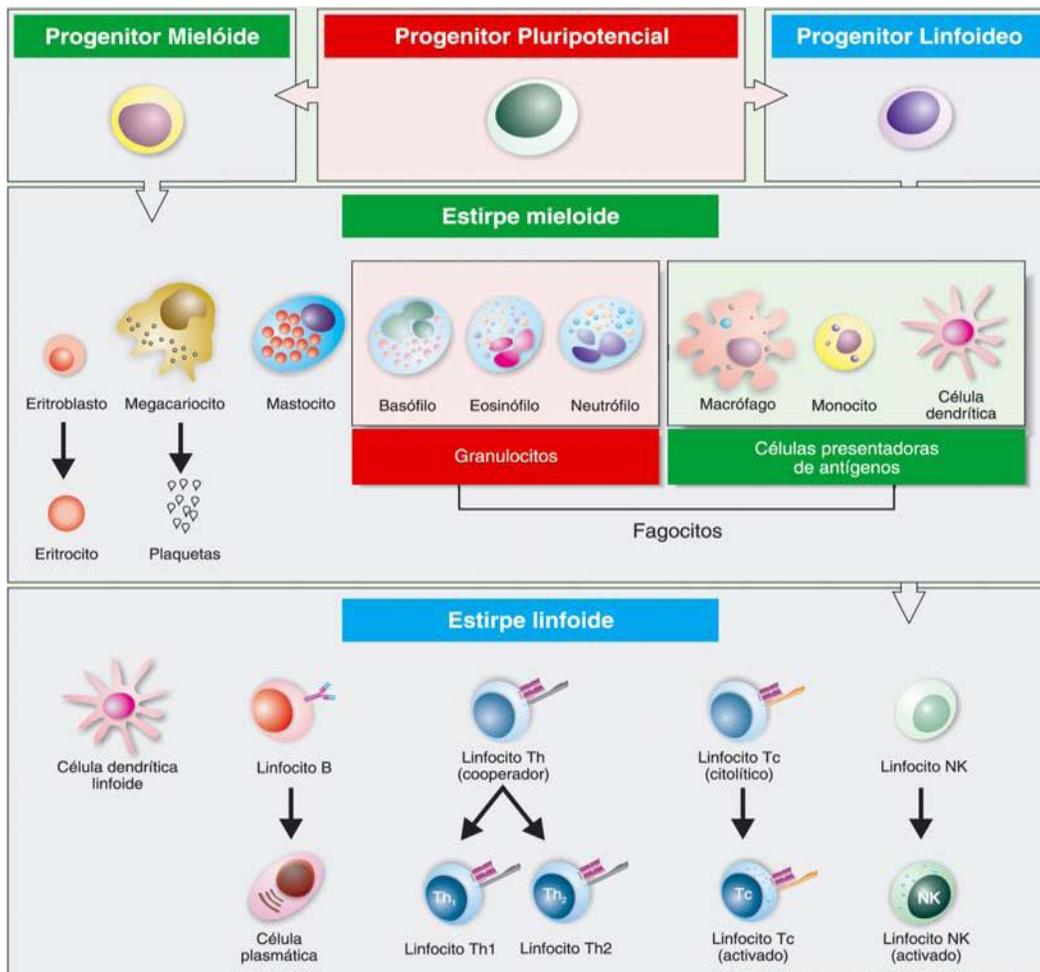


Fig.3 Las células del sistema inmune provienen de células pluripotentes

Fuente: Regueiro J., 2008.

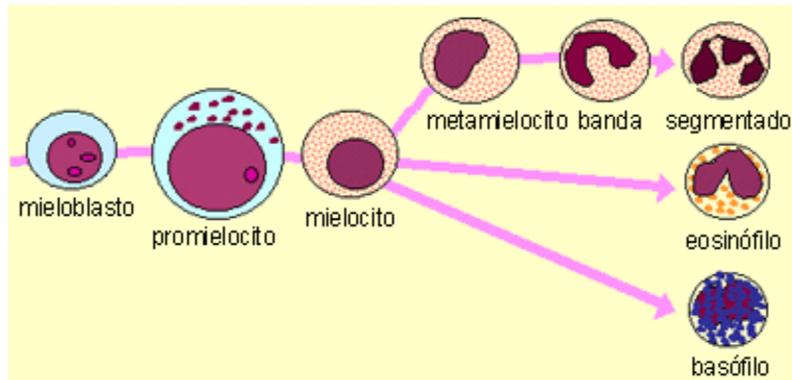


Fig. 4 Maduración de los neutrófilos

Fuente: <http://griho2.udl.es/carles/medicina/mo/granulo.html>

La producción de neutrófilos se estima en  $10^{11}$  células/día, lo cual representa una reserva 10 veces superior al requerimiento diario habitual. Durante la infección aguda se movilizan los neutrófilos de la médula, cuya depleción activa la oferta celular mediante mecanismos compensadores como el aumento de las mitosis o el acortamiento del tiempo de maduración. La vida media intravascular de los neutrófilos es de 6 a 8 horas, mientras que en localizaciones extravasculares varía entre 7 horas y 14 días. La granulocitosis, en una infección aguda, provoca una redistribución de los neutrófilos más que un incremento de su producción, liberando granulocitos de la reserva medular y del depósito marginal al circulante. (13)(14)

Los neutrófilos constituyen entre el 50-60% de los leucocitos circulantes; su función principal es ingerir y destruir a los microorganismos invasores, se lo reconoce por su núcleo segmentado, con dos o más lóbulos unidos por un filamento nuclear delgado. La cromatina se condensa y se tiñe de púrpura intenso; normalmente hay de 2 a 4 lóbulos nucleares; si existe más de 5 lóbulos se lo considera anormal. (14)(15)

Los gránulos del neutrófilo nacen en el tejido hematopoyético de la médula ósea a partir de la granulopoyesis. Tras su nacimiento podemos distinguir tres tipos de neutrófilos: (15)

- **Neutrófilos de reserva:** permanecen en el interior de la médula ósea hasta que son requeridos. Siendo como “soldados acuartelados”. Por otro lado su vocación es salir al exterior, por lo que algunos cuando están maduros salen por el circuito venoso de la medula ósea a la circulación.
- **Neutrófilos circulantes:** cuando entran en sangre.
- **Neutrófilos circulantes marginados:** muchos de los neutrófilos circulantes se dividen en varias subpoblaciones debido a que se ven atraídos por moléculas de adhesión vascular, quedándose adheridos temporalmente a las paredes o endotelio vascular, representan una parte de los leucocitos circulantes.

### 3.1 CITOPLASMA DEL NEUTRÓFILO

El citoplasma está especializado en la captación y el procesado de muchas moléculas, además, en el citoplasma hay gránulos que contienen: proteínas microbicidas, enzimas digestivas, vacuolas de fagocitosis. Existen 3 tipos de gránulos en su citoplasma detallados a continuación. <sup>(15)</sup>

#### 3.1.1 GRÁNULOS PRIMARIOS AZURÓFILOS

Se forman en el estadio de promielocito (estadio de diferenciación de los neutrófilos), pero la célula aún sigue dividiéndose, repartiéndose entre las células hijas y al final en los neutrófilos maduros, representando el 20% del total de los gránulos del neutrófilo. Estos gránulos sirven exclusivamente para desarrollar acciones intracelulares y tienen tres clases de moléculas en su interior: <sup>(14)(15)</sup>

- **Mieloperoxidasas:** (MPO) representan el 5% del total de las proteínas de los gránulos del neutrófilo, catalizan la producción de metabolitos reactivos del oxígeno como: peróxido de hidrogeno, el anión hipoclorito y otros, estos sirven para destruir microorganismos que han sido ingeridos por la célula. <sup>(15)</sup>
- **Proteínas catiónicas defensinas:** son capaces de destruir un amplio espectro de bacterias, gracias a su acción permeabilizante de la pared bacteriana y también pueden destruir hongos y virus. <sup>(15)</sup>

- **Enzimas destructoras de tejido:** son moléculas muy dañinas que inyectadas en las vacuolas permiten al granulocito la digestión del microorganismo ingerido. Así pues catalizan la destrucción de un amplio número de moléculas de nuestros tejidos agrupadas como: hidrolasas, esterases, elastasas, catepsina G y lisozimas. <sup>(15)</sup>

### 3.1.2 GRÁNULOS SECUNDARIOS

Se forman en el estadio inmaduro (mielocito), representando aproximadamente el 80% del total de los gránulos del neutrófilo; estos gránulos sirven exclusivamente para desarrollar acciones extracelulares de secreción, es decir, excretan su contenido al exterior para destruir lo que haya fuera. <sup>(14)(15)</sup>

- **Enzimas:** colagenasa y activador del plasminógeno; los gránulos se abren caminos en lugares infectados donde la matriz es densa mediante la secreción de colagenasa y plasmina y la preparación post-inflamatoria para la cicatrización del tejido dañado por la acción bacteriana. <sup>(15)</sup>
- **Moléculas reguladoras del metabolismo bacteriano:** son bloqueadoras de metales como el hierro, ejerciendo una acción bacteriostática, poseen apo-lactoferrina que regula la disponibilidad de hierro al regular su disponibilidad pueden inhibir indirectamente la división bacteriana. También las proteínas transportadoras de vitamina B12 que regulan la disponibilidad de cobre para las bacterias. <sup>(15)</sup>
- **Moléculas reguladoras de la inflamación:** dinamizan la locomoción de los neutrófilos en los lugares de inflamación; dentro de ellas se encuentran las quimiocinas regulando la función de las células que las producen. Los factores quimiotácticos como el receptor de laminina que facilita la adhesión de las células a la membrana basal como paso previo a la invasión. Otra de las moléculas es el activador del complemento de la fracción C5. <sup>(15)</sup>

### 3.1.3 GRÁNULOS TERCIARIOS

Constituyen menos del 1 % y estos gránulos son de secreción externa, dentro de ellas tenemos: <sup>(14)(15)</sup>

- **Quimiocinas:** representan un porcentaje menor al 1%.
- **Gelatinasas:** enzimas degradadoras de la matriz extracelular; degradan el colágeno desnaturalizado, es decir, el colágeno de la matriz de las zonas dañadas. <sup>(15)</sup>
- **Factores quimiotácticos:** receptor de laminina, factor del complemento C3b que activa el quimiotactismo de los granulocitos. <sup>(15)</sup>

### 3.1.4 OTRAS MOLÉCULAS PRESENTES EN EL CITOPLASMA

- **Enzimas metabólicas:** enzima generadora de ATP (por la vía hexosamonofosfato). <sup>(15)</sup>
- **Maquinaria antioxidante endógena:** para neutralizar las moléculas oxidantes que genera en su metabolismo: Glutación, superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa. <sup>(15)</sup>
- **Glucógeno:** muchas veces actúa en estados de hipoxia y restricciones metabólicas ambientales por lo que acumula glucógeno, tanto como una célula muscular, el cual utiliza como su despensa energética. <sup>(15)</sup>
- **Eicosanoides:** moléculas que se producen, para autoactivar su capacidad quimiotáctica, y al mismo tiempo son vasoconstrictores: prostaglandinas y tromboxanos. <sup>(15)</sup>

### 3.2 MEMBRANA DEL NEUTRÓFILO

La membrana del neutrófilo posee diversas moléculas de superficie como mencionadas a continuación: <sup>(14)(15)</sup>

- **Receptores para opsoninas:** permiten reconocer a las células blanco, a aquellas que han sido opsonizadas, las opsoninas (son sustancias solubles que se unen químicamente con los microbios a fin de prepararlos para la fagocitosis, convirtiéndolos en objetivos). Los receptores para opsoninas son: receptores para fracciones del complemento Fc y receptores para inmunoglobulinas. <sup>(15)</sup>

- **Receptores para la adhesión a la pared vascular:** son principalmente receptores para integrinas la LFA-1 y la VLA-4. <sup>(15)</sup>
- **Glucoproteínas:** moléculas implicadas en el reconocimiento celular.
- **Receptores para quimiocinas y citocinas:** entre los receptores de citocinas tenemos a los receptores para la IL-1 y receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF-G). <sup>(15)</sup>

Gracias a estas moléculas de superficie los gránulos del neutrófilo activan su actividad migratoria y locomotora, pudiendo desplazarse hacia los lugares de infección, y esa actividad migratoria la desarrolla gracias a que el neutrófilo tiene un citoesqueleto rico en actina y miosina, las cuales le sirven para migrar y tubulina, que le permite organizar sus orgánulos mientras migra. Cuando en la célula falla algún componente molecular, existe mayor riesgo de infección. <sup>(14)</sup>

### 3.3 FISIOLÓGÍA DE LOS NEUTRÓFILOS

En un proceso inflamatorio los neutrófilos son las primeras células que migran al lugar de la infección. La inflamación local consiste en la extravasación de líquido y células hacia el lugar de inflamación, en donde ocurre lisis de células y destrucción de componentes de la matriz extracelular. Esta puede ser aguda o crónica; en la primera, el infiltrado es a base de neutrófilos en tanto que en la segunda son principalmente linfocitos y monocitos. <sup>(13)(14)</sup>

La extravasación de leucocitos es un proceso en el que participan diversas moléculas de adhesión y citoquinas desarrollando las siguientes fases:

- Adhesión inicial de los leucocitos y rodamiento de los leucocitos al endotelio
- Activación de los leucocitos y adhesión firme al endotelio
- Extravasación y migración transendotelial a tejidos

Como consecuencia, los leucocitos migran hacia otros tejidos y órganos abandonando el torrente sanguíneo y retornan a él desde la periferia. Este proceso es equivalente para neutrófilos, monocitos o linfocitos, aunque las primeras células que llegan al foco inflamatorio son los neutrófilos. <sup>(13)(14)</sup>

### **3.3.1 PROCESO DE EXTRAVASACIÓN Y MIGRACIÓN DEL NEUTRÓFILO**

Este proceso se realiza en tres fases consecutivas: adhesión celular con el rodamiento de los leucocitos, activación leucocitaria acompañada de una adhesión firme al endotelio, y finalmente la extravasación con la migración a los tejidos.

(13)(14)(16)

#### **3.3.1.1 ADHESIÓN Y RODAMIENTO DE LEUCOCITOS**

Cuando se genera un foco inflamatorio se producen diversas sustancias (C5a, TNF- $\alpha$ , IL-1 entre otros) que inducen la activación de células endoteliales de los vasos sanguíneos. Esta activación endotelial resulta en la producción de sustancias quimiotácticas como IL-8, así también la inducción de moléculas de adhesión, como las selectinas P, E y L, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y el receptor de integrinas (VCAM-1). La expresión de estas moléculas, incrementa la adherencia de los leucocitos a las células endoteliales.

El rodamiento de leucocitos sobre el endotelio activado es consecuencia de interacciones entre moléculas de adhesión celular que son fácilmente reversibles y de una avidez tal que permiten que los leucocitos se desplacen sobre la superficie endotelial permaneciendo adheridos a la misma, involucradas las selectinas y sus ligandos. (13)(14)(16)

#### **3.3.1.2 ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA Y ADHESIÓN FIRME**

En el foco inflamatorio se generan diversas sustancias que activan a los leucocitos; sustancias exógenas (péptidos bacterianos formilados) o endógenos (C5a, factor activador de plaquetas o leucotrieno B4). En esta fase también es importante la participación de quimiocinas producidas por el endotelio.

El fenómeno de activación leucocitaria es aparentemente muy rápido y resulta en la generación de señales que inducen la activación de integrinas de la membrana (integrinas  $\beta$ -2 en neutrófilos e integrinas  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 y  $\beta$ -7 en el caso de linfocitos). La activación de integrinas en la membrana incrementa la afinidad por sus ligandos, VCAM-1. (13)(14)(16)

### 3.3.1.3 EXTRAVASACIÓN Y MIGRACIÓN EN TEJIDOS

En el mecanismo de extravasación y migración de leucocitos están implicados las integrinas  $\alpha 4/\beta 1$ ,  $\alpha 5/\beta 1$  y LFA-1, así como las moléculas CD44 y CD31. La migración de los neutrófilos en el intersticio de los tejidos está dirigida por la presencia de quimiocinas y la densidad de los ligandos de receptores de adhesión; la dirección de migración de los leucocitos esta así determinada tanto por el gradiente de concentración de la sustancia que induce atracción de las células (quimiotaxis) como por la región del tejido que sea más adhesiva para el leucocito. Una vez que ha ocurrido la extravasación, los leucocitos inician un proceso de migración con la participación de integrinas (LFA-1,  $\alpha 4/\beta 7$ ) y sus ligandos (ICAM-1, ICAM-2). <sup>(13)(14)(16)</sup>

Podemos decir que la migración de leucocitos del torrente sanguíneo hacia diversos tejidos es un fenómeno regulado por tres factores: las moléculas de adhesión expresadas por el leucocito, las expresadas por las células endoteliales y el tipo de factor activador/quimiotactico que se está produciendo en este tejido. La conjunción de estos tres factores determina el tipo de leucocito que hace la interacción inicial y posteriormente el rodamiento, la activación, la adhesión firme y la migración transendotelial. La ausencia de uno de estos factores por ejemplo la sustancia quimiotáctica, da lugar a la interacción inicial y el rodamiento, pero no la adhesión firme, con la consecuente desunión del leucocito del endotelio. La ausencia de moléculas que median la migración transendotelial conducirían a que se den las cuatro primeras fases de la interacción-leucocito-endotelio, pero el resultado final sería el desprendimiento del leucocito, aun cuando hubiese ocurrido su firme adhesión al endotelio. <sup>(13)(14)(16)</sup>

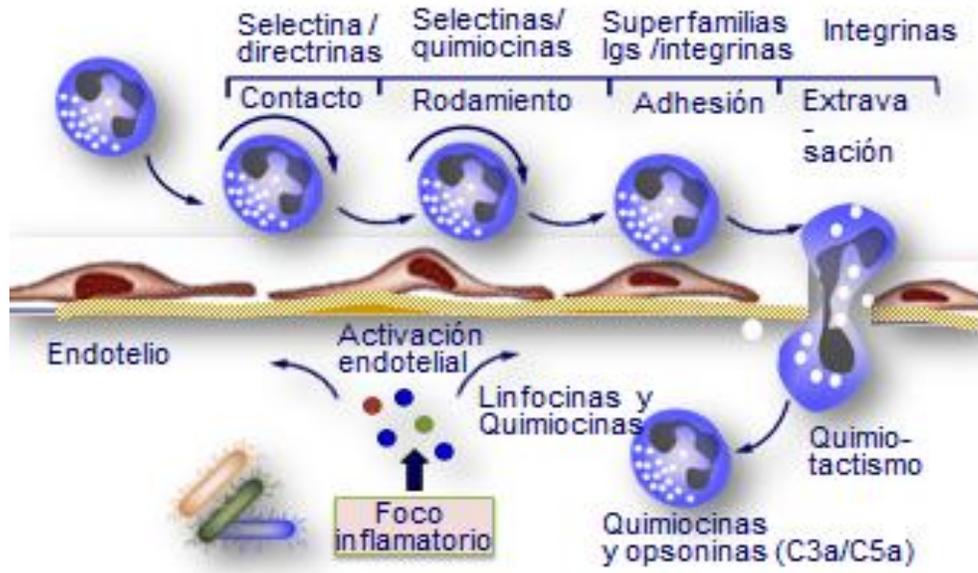


Fig. 5 Proceso de Migración del Neutrófilo del torrente sanguíneo hacia un foco inflamatorio

Fuente: Frías M., 2007

### 3.3.2 FAGOCITOSIS

La capacidad para ingerir y destruir microorganismos es un componente clave para la defensa del huésped. En el proceso de fagocitosis, los neutrófilos tienen la capacidad de ingerir más de una bacteria u hongo al mismo tiempo, y esto se aplica a otras estructuras macromoleculares. Cuando en un proceso infeccioso participa un elevado número de fagocitos, puede formarse un absceso lleno de pus (células fagocitarias muertas o destruidas parcialmente). <sup>(14)(17)</sup>

#### 3.3.2.1 RECONOCIMIENTO Y ADHESIÓN DE LA PARTÍCULA

Los leucocitos expresan varios receptores que reconocen estímulos externos y emiten señales activadoras:

- Receptores de tipo toll (para productos microbianos)
- Receptores acoplados a la proteína G (reconocen péptidos bacterianos cortos, algunas quimiocinas y productos de degradación del complemento como C5a)
- Receptores para las opsoninas

La partícula que se va a fagocitar esta revestida de factores séricos llamados opsoninas y estas partículas opsonizadas se unen a receptores situados en la superficie de neutrófilos y macrófagos. <sup>(14)(17)(18)</sup>

Las partículas con anticuerpos específicos de clase IgG se unen a los receptores de membrana para el fragmento Fc de IgG. La IgM no tiene capacidad de opsonizar, pero su unión a las partículas induce la activación del sistema de complemento. Esto lleva a que el componente C3b se deposite sobre las partículas, las cuales son reconocidas por los receptores de los fagocitos para el fragmento C3b. <sup>(14)(17)(18)</sup>

### 3.3.2.2. ENGLOBAMIENTO DE LA PARTÍCULA

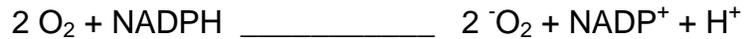
La unión a los receptores promueve señales de comunicación intracelular que resultan en la invaginación de la membrana del fagocito. La célula fagocítica emite extensiones citoplasmáticas o pseudópodos que rodean a la partícula hasta quedar englobada dentro de un fagosoma cuya membrana procede de la membrana de la célula. Esta membrana del fagosoma se fusiona con la membrana limitante de un granulo lisosomal produciéndose la descarga del contenido del lisosoma en el fagolisosoma. Esto puede ocurrir en más de un punto de la membrana celular. Después se da la degranulación paulatina del fagocito y la liberación de productos leucocitarios al exterior por tres formas: regurgitación durante la ingestión, endocitosis inversa (captación de partículas ingeribles encima de superficies planas-endotelios) y citolisis (muerte del leucocito). <sup>(14)(17)(18)</sup>

### 3.3.2.3 DEGRADACIÓN Y DESTRUCCIÓN DE LA PARTÍCULA

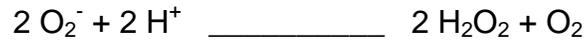
Existen dos mecanismos: Mecanismos dependientes de oxígeno y los no dependientes de oxígeno. <sup>(14)(17)(18)(19)</sup>

**a) Mecanismos dependientes de oxígeno:** La unión de partículas a los receptores de la membrana del fagosoma del neutrófilo provoca el denominado estallido respiratorio (por activación de la ruta de la hexosa monofosfato), que produce mucho NADH. <sup>(14)(17)(18)(19)</sup>

La activación de una oxidasa unida a la membrana, que utiliza NADPH como donador de electrones, produce superóxido a partir del O<sub>2</sub>:



El superóxido genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en forma espontánea o por catálisis de la Superóxido - Dismutasa:



El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el compuesto bactericida importante del metabolismo del O<sub>2</sub> en los neutrófilos, pero su efecto destructor se hace potente por la formación de un Hipohaluro.



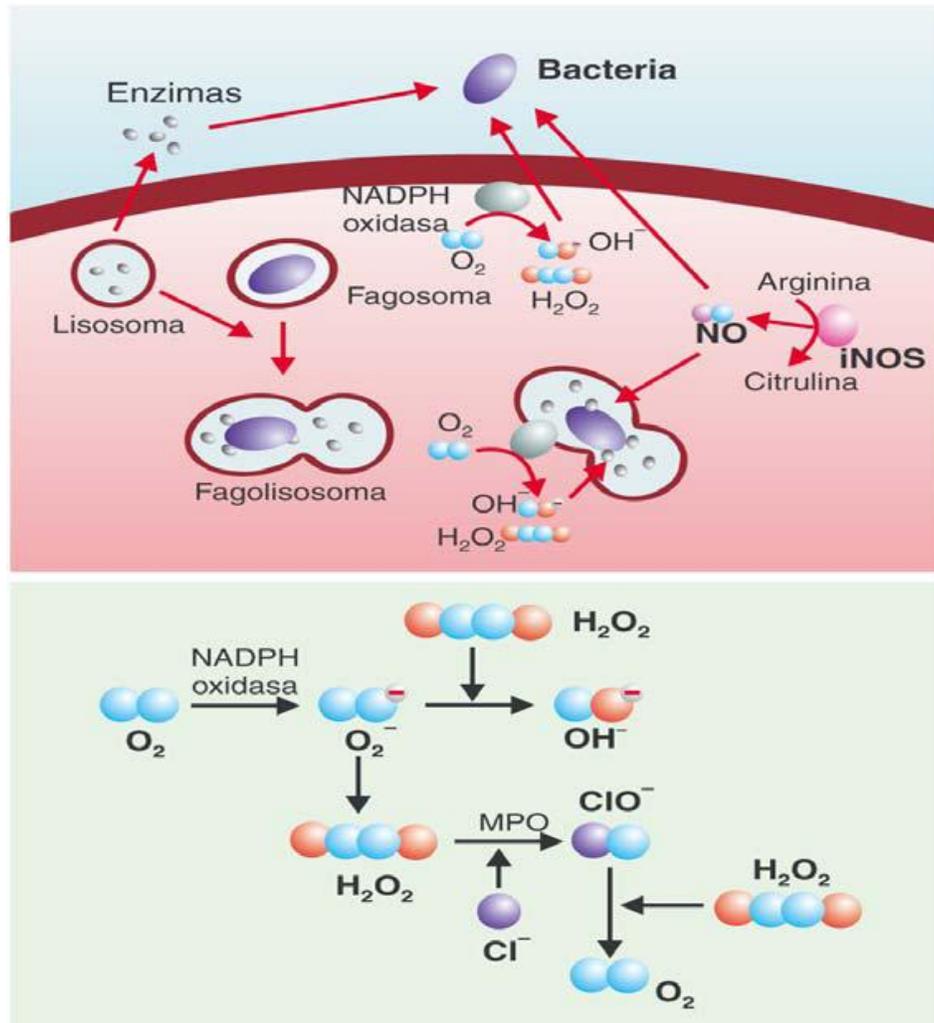


Fig. 6 Mecanismos microbicidas del fagocito (estallido respiratorio)

Fuente: Regueiro J., 2008.

**b) Mecanismos independientes de oxígeno:** por sustancias contenidas en los gránulos de los leucocitos como la proteína bactericida por incremento de la permeabilidad (BPI), lisozima, lactoferrina, proteína básica principal, defensinas, disminución del pH 4-5 para la acción de enzimas lisosomales. <sup>(14)(17)(18)(19)</sup>

Gránulos específicos: lactoferrina, lisozima, fosfatasa alcalina, colagenasa tipo IV, moléculas de adhesión, activación del plasminógeno, fosfolipasa A2.

Gránulos azurófilos: MPO, lisozima, proteínas catiónicas, elastasas, BPI, defensinas, catepsina G, fosfolipasa A. <sup>(14)(17)(18)(19)</sup>

## 4. LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una zoonosis parasitaria multifacética debido a la infección por un protozoo del género *Leishmania* que puede afectar a los seres humanos y otras especies de mamíferos. Estos parásitos son transmitidos a través de la picadura de pequeños insectos pertenecientes al género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo. Las *Leishmanias* en su mayoría son una zoonosis (infecciones que afectan al hombre y a otros animales), que tiene como reservorios primarios a mamíferos silvestres y algunos mamíferos domésticos como reservorios secundarios. <sup>(1)(2)(3)</sup>

### 4.1 EPIDEMIOLOGÍA

La leishmaniasis es una enfermedad de prevalencia alta en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, tales como el este y sureste de Asia, Oriente Medio, norte y este de África, el sur de Europa y América Central y Sudamérica. Es endémica en 88 países en áreas tropicales, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. <sup>(1)(2)(3)</sup>

La Organización Mundial de la Salud la considera la cuarta enfermedad más importante en el trópico. Casi 350 millones de personas viven en áreas endémicas y se calcula que 12 millones de individuos están infectados con el parásito, con 1,5 a 2 millones de nuevos casos cada año. Existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección. El número de casos de leishmaniasis está aumentando debido principalmente a los cambios del medio ambiente generados por el hombre, lo que aumenta la exposición humana al vector. <sup>(1)(2)(3)</sup>

En Bolivia entre el año 1983-2006 fueron registrados 35714 casos, aumentado en ciertos lugares como ser: Coroico, Chulumani, Irupana, Ocobaya, Coripata, Cajuata, Ixiamas, San Buenaventura, Tumupasa, Riberalta, Reyes, Guayaramerin, Cobija, Rurrenabaque, etc.

Los reportes oficiales de casos notificados son: <sup>(2)(20)</sup>

- ✓ 120 casos reportados en 1982.
- ✓ 250 casos reportados en 1988.
- ✓ 1033 casos reportados en 1992.
- ✓ 2310 casos reportados en 1996 (Ministerio de Salud).

En el año 2007, se registraron 3153 casos, de los cuales 1753 (55.6%) corresponden al departamento de La Paz, seguido por Beni (574 casos), Pando (416 casos), Cochabamba (341 casos) y Santa Cruz (44 casos). <sup>(2)(20)</sup>

## 4.2 AGENTE ETIOLÓGICO

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozoo dimórfico del género *Leishmania*, que pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*. Tiene dos estadios evolutivos:

- **El Amastigote:** es inmóvil e intracelular obligatorio dentro de los macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial, tiene forma ovalada o elipsoidal, un núcleo central y un kinetoplasto anterior, además cuenta con un flagelo intracelular. Su tamaño varía en función de las especies de 3,5 a 7  $\mu\text{m}$  aproximadamente. <sup>(1)(2)(20)(21)</sup>
- **El Promastigote:** es móvil y flagelada, se desarrolla en el intestino del vector, es fusiforme con un núcleo central y un kinetoplasto anterior, un flagelo anterior libre, su tamaño varía entre 10 y 25  $\mu\text{m}$ . Se multiplica en el vector y migra a la parte anterior del mosquito y está allí hasta ser inoculada. <sup>(1)(2)(20)(21)</sup>

Se han descrito cerca de 30 especies de las cuales alrededor de 20 provocan enfermedad en el hombre. El género *Leishmania* se subdivide en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, el subgénero *Leishmania* incluye a muchas especies, unas están distribuidas en el viejo mundo (África, Asia y Europa) y otras en el nuevo mundo (América tropical). <sup>(1)(2)(20)</sup>

### 4.3 EL VECTOR

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de *Flebótomos*, pequeñas moscas que abundan todo el año en las zonas tropicales y en el verano, en las zonas templadas: se reconocen cinco géneros de *Flebótomos* principales: *Phlebotomus*, *Sergentomya*, *Lutzomyia*, *Warileya* y *Brumptomya*. Pero, se reconocen como vectores de la *Leishmania* solo a dos: En Europa, Asia y África, el género *Phlebotomus*, y en América, el género *Lutzomyia*.<sup>(1)(2)(20)(21)</sup>



Fig. 7 *Lutzomyia longipalpis* en América



Fig. 8 *Phlebotomus* sp. Viejo Mundo

Fuente: Uribarren Teresa, Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina UNAM.

Son insectos dípteros de la familia *Psychodidae* conocidos como *Flebótomos*, existen más de 700 especies en el mundo, de las cuales alrededor de 30 son vectores comprobados y otras son vectores sospechosos. Su tamaño varía entre 2 a 5 mm de longitud, el cuerpo está cubierto de pelos incluyendo las alas. Típicamente son insectos jorobados que presentan las alas paradas, en Bolivia los *Flebótomos* se conocen con el nombre de *champari*, *roco-roco*, *plumilla*. Por lo general presentan hábitos nocturnos y pican durante la noche, pero pueden picar en el día cuando son molestados en su habitat selvático, solo las hembras pican porque es indispensable la ingesta de sangre para que cumplan el ciclo gonotrofico (maduración de los huevos). El insecto es atraído por el huésped por la emisión del dióxido de carbono, luz y se vuelve agresiva cuando el hombre interrumpe los sitios en donde se encuentra en reposo.<sup>(1)(2)(20)(21)</sup>

En Bolivia existen diferentes vectores identificados como ser:

- *Lutzomyia longilpalpis* en los yungas de La Paz (*L. chagasi*)
- *Lutzomyia yucumensis*, *Lutzomyia llanosmartinsi*, *Lutzomyia carrerai carrerai* en zonas bajas (*L. braziliensis*).
- *Lutzomyia muneztovari anglesi* en los yungas de La Paz (*L. braziliensis*)
- *Lutzomyia muneztovari anglesi* en La Paz provincia Inquisivi (*L. amazonensis*)

#### 4.4 RESERVORIO

Existe una gran variedad de animales silvestres y domésticos que han sido implicados como reservorios de las especies de *Leishmania* en América. Es evidente la relación ecológica estrecha que existe entre los vectores de un parásito y su animal reservorio. En América, el reservorio identificado en la leishmaniasis son los perros; así mismo en Bolivia se han encontrado altas tasas de infección en zonas subandinas de La Paz (yungas). <sup>(2)(20)</sup>

#### 4.5 CICLO BIOLÓGICO

El parásito en su estadio amastigote habita en las células de los mamíferos principalmente del sistema fagocito mononuclear (sistema retículo endotelial), como macrófagos tisulares, médula ósea, etc. Cuando el insecto vector pica al mamífero reservorio, provoca sangrado del tejido y acumulo de sangre en el sitio de la picadura. Luego los amastigotes pasan al intestino medio del vector donde se transforman en promastigotes, se multiplican y llegan posteriormente al aparato bucal del insecto transformándose en promastigotes metacíclicos que son la forma infectante para los mamíferos. Cuando un insecto infectado pica, inocula los parásitos en el sitio de la picadura y posteriormente los promastigotes ingresan o son introducidos en las células fagocíticas donde se transforman en amastigotes y se multiplican intracelularmente. Las células parasitadas se colman de parásitos y se rompen dejando libres amastigotes que invaden nuevas células. <sup>(1)(2)(20)(21)</sup>

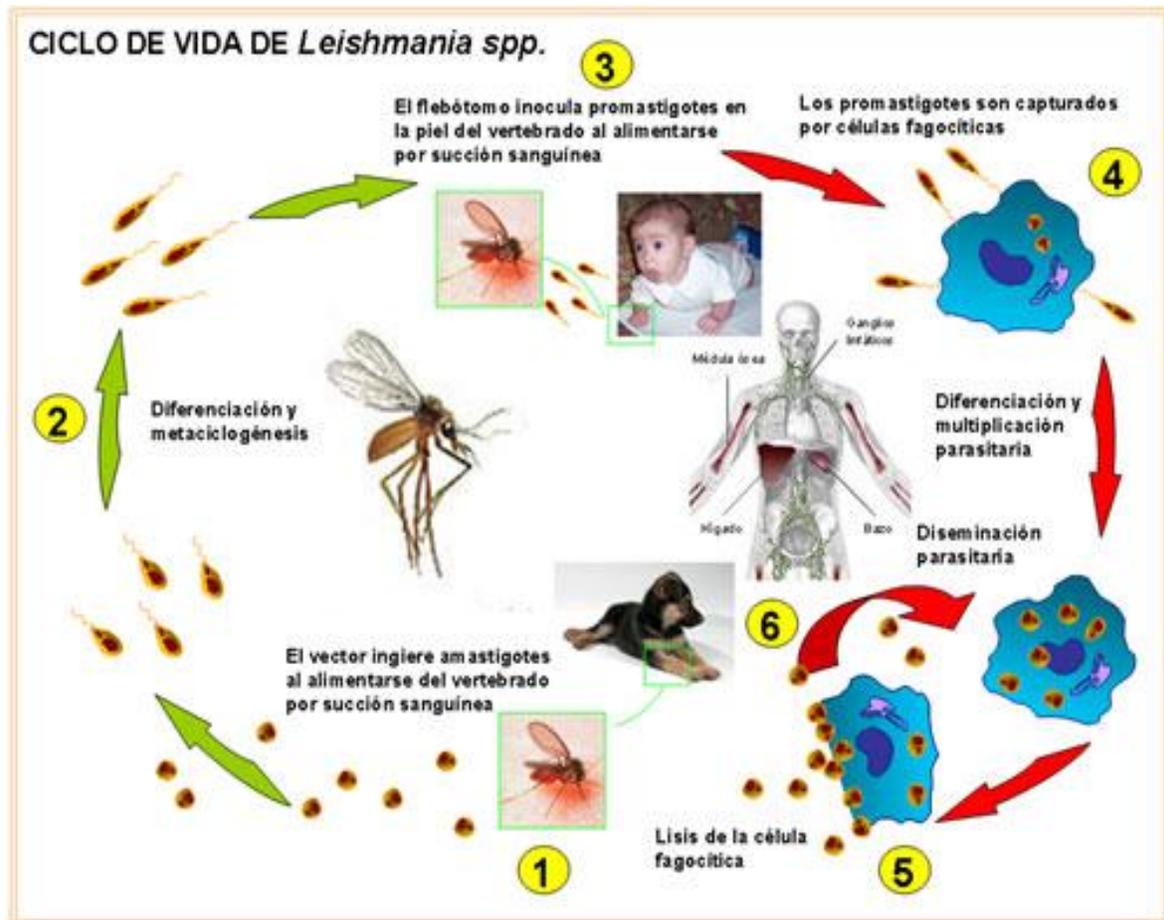


Fig. 9 Ciclo Biológico de la *Leishmania* spp.

Fuente: <http://www.madrimasd.org/gestion2006/img/Noticias/leishmaniosis02-UAM.jpg>

#### 4.6 MANIFESTACIONES CLINICAS

La infección por leishmaniasis va acompañada de diferentes signos y síntomas como ser: fiebre persistente, sudoración nocturna, fatiga, debilidad, pérdida de apetito, malestar abdominal, vómito, diarrea, tos, etc.

En la piel puede presentarse macula o papula eritematosa, úlcera cutánea, obstrucción nasal, hemorragia nasal o epistaxis, úlceras y erosión tisular, esplenomegalia, hepatomegalia, etc. <sup>(1)(2)(20)(21)</sup>

#### 4.7 CLASIFICACIÓN

Según las manifestaciones clínicas como se presentan en el hombre, pueden clasificarse en:

#### 4.7.1 LEISHMANIASIS CUTÁNEA

Se presenta con lesiones típicas en las partes expuestas del cuerpo, donde las *Lutzomyias* pueden picar miembros superiores e inferiores y cara. El aspecto de la lesión inicial es un leve enrojecimiento, frecuentemente pruriginoso, seguido, a los pocos días, por una leve infiltración papulosa de unos 3 mm de diámetro y con mucha frecuencia con una o dos diminutas vesículas; puede dar lugar a una diminuta excoriación por el rascado, que se puede transformar en un proceso ulcerativo. 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, originando una úlcera grande, la cual es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados y cortados en forma de sacabocado e indurada que recuerda la imagen de un cráter. Este tipo de leishmaniasis puede ser provocado por cualquiera de las especies de *Leishmania*. <sup>(1)(2)(20)(22)</sup>

#### 4.7.2 LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA

Las manifestaciones clínicas de la forma mucocutánea se presentan muchos meses o años después de haber cicatrizado la forma cutánea; ocasionalmente aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel. El principal agente causal es *L. braziliensis*, con menos frecuencia *L. panamensis*.

Las lesiones se inician principalmente a nivel del tabique nasal cartilaginoso; pero pueden comenzar en otras partes de las vías aéreas superiores. Al inicio solo se aprecia una discreta secreción de moco, como si el enfermo tuviera una rinitis o un resfriado, luego, se produce la inflamación de la mucosa, que se vuelve eritematosa, edematosa y dolorosa; la lesión se profundiza y produce una pericondritis. Cuando las lesiones están avanzadas, se presenta exudación y ulceración de la mucosa, luego, se compromete el cartílago y se produce la perforación del tabique, que si destruye parcial o totalmente el tabique determinará la caída de la punta de la nariz. <sup>(1)(2)(20)(22)</sup>

Si la enfermedad progresa y se profundiza, el proceso se extiende del vestíbulo al labio superior, paladar, pilares, úvula y la garganta. Si no hay tratamiento, la enfermedad puede llevar a la muerte.

#### **4.7.3 LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA**

Es una forma clínica muy rara, asociada a *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Se inicia bajo la forma de lesiones localizadas, de aspecto nodular o en placa infiltrada, que poco a poco se diseminan a todo el cuerpo. La presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas, úlceras y algunas veces, lesiones verrugosas que se confunden con la piel normal, dan un aspecto lepromatoso; esta no invade órganos internos. Las lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento. <sup>(1)(2)(20)(22)</sup>

#### **4.7.4 LEISHMANIASIS VISCERAL**

La *L. donovani* es la causante de las lesiones a nivel de los órganos: particularmente el hígado, bazo, medula ósea y ganglios linfáticos, sin que existan indicios de infección a nivel de la piel. Están acompañados de fiebre, hepatoesplenomegalia, caquexia y pancitopenia. La leishmaniasis visceral a menudo es fatal si no se efectúa tratamiento adecuado. El control de la leishmaniasis va a depender de la magnitud de la respuesta inmunológica, de las células participantes, interleuquinas y citoquinas liberadas en el curso de la infección. <sup>(1)(2)(20)(22)</sup>

#### **4.8 RESPUESTA INMUNE EN LEISHMANIASIS**

En la leishmaniasis después de la inyección de los parásitos en la piel del huésped, se inicia un proceso inflamatorio local, con acumulación de células residentes y células de sangre periférica que migran al tejido a través del endotelio vascular.

Las poblaciones celulares que inicialmente se encuentran son pertenecientes a la respuesta inmune innata, que, además de ejercer un control inicial de la infección, podría influir en el direccionamiento de la respuesta inmune específica, con lo que se desarrolla resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. <sup>(4)(23)</sup>

En una infección por leishmaniasis, los granulocitos son la primera y más significativa población en llegar a la piel, uno o dos días más tarde llegan los macrófagos y células NK; estos últimos se convierten en la población predominante durante esta etapa de la infección. Posteriormente, entre la primera y la segunda semana, arriban los linfocitos T específicos y completan el equipo celular de defensa. Entre las células de la respuesta innata, cuyo papel en la infección por *Leishmania* es importante, se encuentran los neutrófilos, eosinófilos, monocitos-macrófagos, células NK y mastocitos. <sup>(4)(23)(24)</sup>

Aunque numerosos estudios muestran que el control de la leishmaniasis depende de la respuesta de linfocitos T que se establece después de la primera semana de la infección, en la actualidad se quiere dar igual importancia a las células de la respuesta innata, al ser ellas las primeras que entran en contacto con el parásito.

#### **4.8.1 RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS AL SITIO DE INFECCIÓN**

En la leishmaniasis, la migración de neutrófilos, eosinófilos y células NK es inducida por la presencia del parásito. Esta inducción puede ser directa, cuando moléculas propias del parásito estimulan la llegada de neutrófilos o eosinófilos, o indirecta, cuando el parásito estimula la producción de citoquinas, como la IL-8 o proteínas inflamatorias del macrófago  $\alpha$  y  $\beta$  (MIP- $\alpha$  y  $\beta$ ) y proteína quimiotáctica del macrófago-1 (MCP-1) que a su vez, inducen migración de neutrófilos, células NK y monocitos, respectivamente. Así las células de la respuesta innata son atraídas al sitio inflamatorio por la influencia del parásito. Sin embargo, aún no está claro si esta atracción celular aumentada deriva en un efecto benéfico para el huésped o si forma parte de la estrategia defensiva del parásito. <sup>(4)(23)(24)</sup>

Luego de ser atraídas por diferentes estímulos, las células inician su migración al sitio inflamatorio. Estudios realizados en ratones, han encontrado que los neutrófilos e incluso los eosinófilos son la población predominante durante la etapa inicial de la infección entre las 2 y 72 horas postinfección. Estas células se han encontrado en casos de leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral, en casos primarios o de reactivación y en infecciones causadas por diferentes especies de *Leishmania*.<sup>(4)(23)(24)</sup>

El hecho de que los neutrófilos sean las primeras células en llegar al sitio de infección, promueve el estudio de sus acciones frente al parásito, de tal manera estudios realizados en ratones proveen evidencia de que los neutrófilos junto a los macrófagos son capaces de matar de manera eficiente a *L. amazonensis*, poniendo en evidencia la variedad de mecanismos que permiten a los neutrófilos a que cooperen eficientemente con los macrófagos en la inmunidad innata frente a *Leishmania*.<sup>(25)(26)(27)</sup>

#### **4.8.2 FAGOCITOSIS Y PERMISIVIDAD DE LAS CÉLULAS**

Una vez que las células llegan al sitio de infección y entran en contacto con los parásitos, se inicia una interacción entre ambos que puede derivar o no en el control de la infección. El parásito de *Leishmania* al ser intracelular puede ser fagocitado y albergado por los neutrófilos, eosinófilos, monocitos y mastocitos. La permisividad de una célula a la entrada del parásito es un factor decisivo para el establecimiento de la infección y el desarrollo de enfermedad. Estudios muestran que los neutrófilos y los macrófagos de hámsteres sensibles a la infección por *Leishmania* hospedan una mayor cantidad de parásitos viables que los de hámsteres resistentes. Esto muestra que la permisividad determina, al menos en parte, la susceptibilidad o la resistencia del huésped y que un funcionamiento inadecuado de estas células, en términos de cuántos parásitos se internalizan, puede influir en el desarrollo de enfermedad.<sup>(4)(23)(24)</sup>

Los dos estadios del ciclo de la vida de *Leishmania*, amastigotes y promastigotes, entran a la célula a través de receptores específicos, caracterizados principalmente en macrófagos. Los receptores de estas células son el ligando para diferentes moléculas del parásito, además de moléculas propias, como fragmentos del complemento o inmunoglobulinas, que inducen la opsonización. <sup>(4)(23)(24)</sup>

En los neutrófilos, la internalización se produce a través del receptor de complemento CR3 y la fibronectina. Tanto los parásitos enteros como sus constituyentes inhiben o retrasan la apoptosis de los neutrófilos a través de citoquinas. En sí, gracias al parásito estas células podrían vivir más tiempo y convertirse en una fuente de infección para otras poblaciones celulares.

Según estudios los parásitos fagocitados por los neutrófilos pierden más rápidamente su integridad que cuando han sido fagocitados por macrófagos, que otros describen una mayor sobrevivencia del parásito en el interior del neutrófilo. Esto es importante porque, de acuerdo con el tipo de célula que llegue al sitio inflamatorio, puede variar la respuesta generada y llevar a una menor o mayor contención del parásito. <sup>(28)(29)</sup>

Otro mecanismo leishmanicida es el estallido respiratorio, radicales derivados de oxígeno y nitrógeno; el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el S-nitrosotiol y el NO son los radicales oxidativos con actividad anti-*Leishmania*. Pese a ello, el parásito puede evadir la muerte por esta vía e induce una menor respuesta oxidativa o destruye y detoxifica los radicales. <sup>(28)(29)</sup>

En diversos procesos infecciosos la presencia de neutrófilos se asocia con susceptibilidad o resistencia a la infección. Algunos estudios sugieren un papel benéfico de esta célula durante la etapa temprana de la infección y relacionan su presencia con lesiones menos graves y una menor carga parasitaria. Sin embargo, otros estudios muestran que el neutrófilo es un actor en la patogenia de la enfermedad y relacionan su presencia con lesiones de mayor tamaño, disminución del IFN- $\gamma$  (relacionada con resistencia a la infección) y aumento de IL-4 (relacionada con susceptibilidad a la infección). Otros estudios, muestran que el papel deletéreo o protector de esta célula varía según la susceptibilidad del

huésped, y han encontrado que los neutrófilos de animales resistentes inducen un mejor control del parásito y producen moléculas protectoras como TNF- $\alpha$  y elastasa, en contraste con los neutrófilos de animales susceptibles, que afectan el control parasitario y producen moléculas dañinas, como TGF- $\beta$  y prostaglandina E2. En sí, su papel sería dual, según las circunstancias, y actuaría como controlador del parásito o como favorecedor del desarrollo de lesión. <sup>(28)(29)</sup>

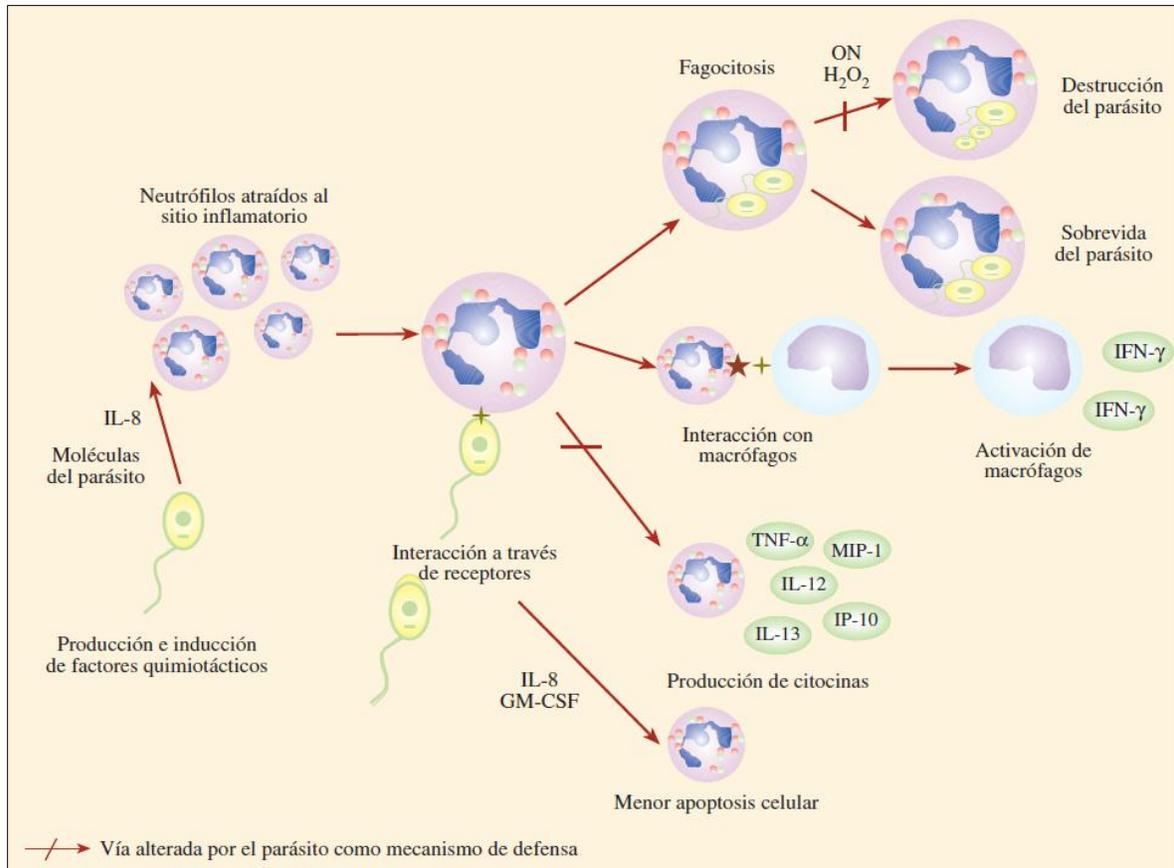


Fig. 10 Interacción entre neutrófilos y parásitos de *Leishmania*

Fuente: Rev. Piel 2005; 20 (8): 383-395.

#### 4.8.3 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS Y ACTIVACIÓN CELULAR

Gran parte de los factores que condicionan la susceptibilidad o la resistencia del huésped se deben a diferencias funcionales en los macrófagos, al ser éstos las células centrales en la infección por *Leishmania*. El macrófago actúa como célula huésped, como presentadora de antígenos a los linfocitos T y como efectora en la destrucción de *Leishmania*; por ello, alteraciones en la permisividad y la activación

de esta célula fácilmente tienen como consecuencia el desarrollo de la enfermedad. <sup>(30)(31)</sup>

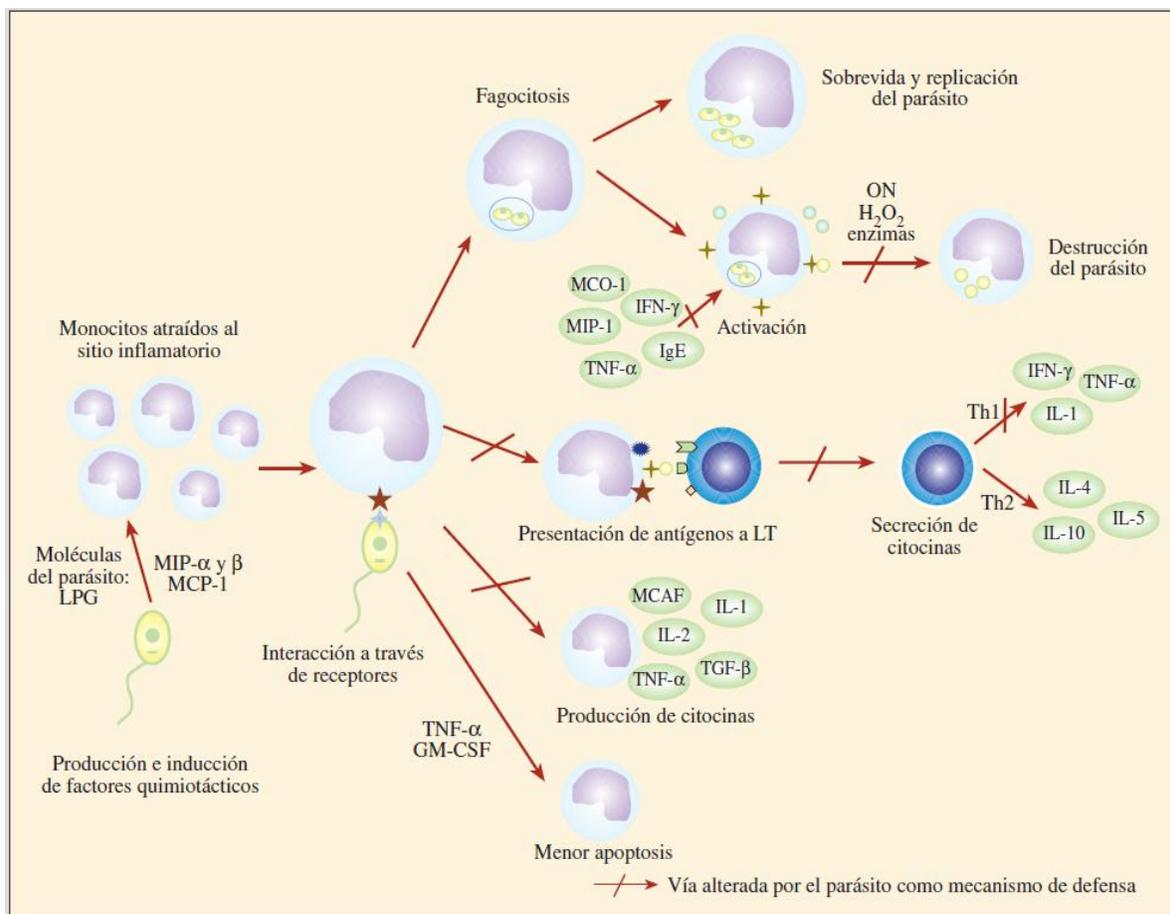
En la eliminación del parásito, algunos son eliminados por lisis del complemento y los que escapan son fagocitados por los macrófagos y englobados por la vacuola parasitófora donde evolucionan a amastigotes, en el ambiente ácido del fagolisosoma. El Amastigote sobrevive gracias a la enzima glicoproteína (gp63) cuya actividad proteolítica a pH ácido le permite degradar enzimas lisosomales. El lipofosfoglicano (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 inflamación. <sup>(30)(31)(32)(33)</sup>

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- $\gamma$  e IL-2. Estas citoquinas y otras producidas por las células fagocíticas tales como TNF- $\alpha$  y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (CSF-GM) activan a la célula infectada para que sea ella la que destruya y elimine los amastigotes que tiene en su interior. <sup>(30)(31)(32)(33)</sup>

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 lesiones. 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 IFN- $\gamma$  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 al facilitar la

captación de los promastigotes por las inmunoglobulinas fijadas en los macrófagos, facilitando la opsonización. <sup>(30)(31)(32)(33)</sup>

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<sup>+</sup> 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- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que inducen la producción de 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- $\beta$ . <sup>(4)(30)(31)(32)(33)</sup>



**Fig. 11 Interacción entre macrófagos y parásitos de *Leishmania*.**

Fuente: Rev. Piel. 2005; 20 (8): 383-395.

#### 4.8.4 CITOQUINAS

Las citoquinas secretadas en la respuesta inmune frente a la leishmaniasis son importantes para el direccionamiento hacia una respuesta Th1 o Th2.

A las citoquinas anteriormente se las llamaba de acuerdo a las células que las producían; linfoquinas, monocinas o interleucinas según fuesen producidas por los linfocitos, los monocitos-macrófagos o PMN. Estudios posteriores permitieron determinar que tales sustancias eran producidas por diferentes tipos celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, NK) y células no inmunes (fibroblastos, células endoteliales) por lo que se le dio un nombre más amplio: citoquinas o citocinas. Dentro de este nombre se agrupan: interleucinas, quimioquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral. <sup>(34)(35)</sup>

El término interleucina o interleucina se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *In vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF y el TGF. <sup>(34)(35)</sup>

Algunos autores consideran las citoquinas como inmunohormonas que ejercen su acción en forma autocrina o paracrina, produciendo efectos muy variables que comprenden: la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, la regeneración tisular y la angiogénesis, entre otras. Durante la activación celular que sigue como respuesta a un estímulo, se producen y se unen de forma transitoria a receptores específicos de membrana. <sup>(34)(35)</sup>

Se llevan a cabo regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general no actúan solas sino con otras citoquinas, producidas por la misma célula pudiendo inducir, potenciar o inhibir la producción de otras citoquinas y/o modular negativa o positivamente los efectos de dichas citoquinas. Por otro lado al actuar sobre diferentes tipos celulares ejercen múltiples efectos (pleiotrópicas) e igualmente comparten muchos de ellos (redundantes). <sup>(34)(35)</sup>

#### 4.8.4.1 PROPIEDADES GENERALES

Las citoquinas son proteínas o glucoproteínas secretadas, de bajo peso molecular (menor a 30 kDa). Dentro del sistema inmune innato, los macrófagos son las células más comprometidas, mientras que en el sistema inmune específico, son las células T colaboradoras, pues sus citoquinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmune, una vez activadas por el contacto con las APC. Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su acción, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, dándose una determinada respuesta biológica. (34)(35)(36)

Las diversas citoquinas pueden exhibir una o varias cualidades:

- **Pleiotropía:** múltiples efectos al actuar sobre diferentes células.
- **Redundancia:** varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto.
- **Sinergismo:** dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente.
- **Antagonismo:** inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos.

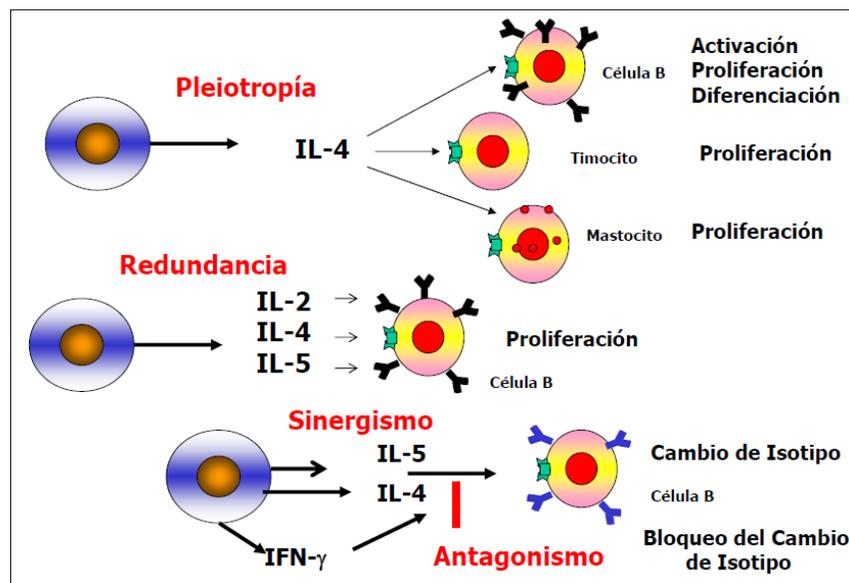


Fig. 12 Modo de acción de las citoquinas

Fuente: Aguirre de Avalos, 2002. <http://www.uv.es/jcastell/Inflamacion.pdf>

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).<sup>(34)</sup>

La acción de las citoquinas se puede clasificar en:

- Autocrina
- Paracrina
- Endocrina clásica (en pocas ocasiones)

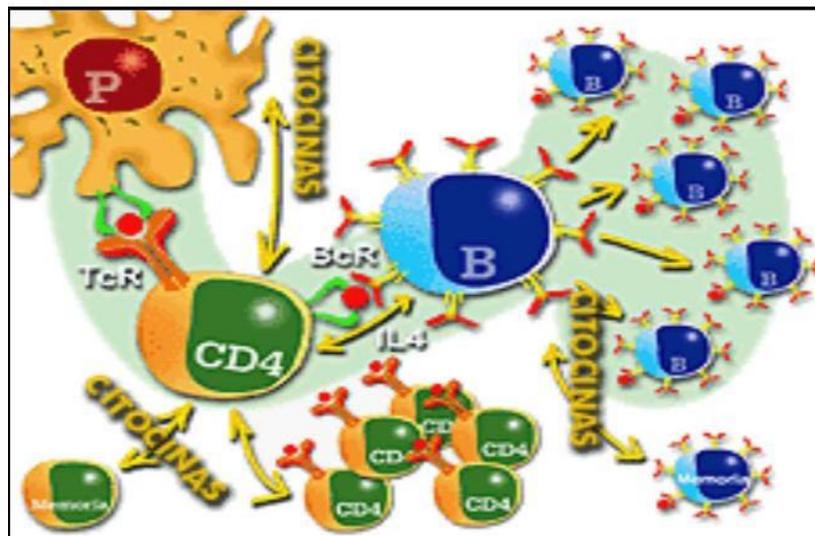


Fig. 13 Acción de las citoquinas sobre las células  
Fuente: Aguirre de Avalos, 2002.

#### 4.8.4.2 PRINCIPALES ACCIONES DE LAS CITOQUINAS

Generalmente actúan como mensajeros intercelulares produciendo:<sup>(34)(35)(36)</sup>

- Activación de los mecanismos de inmunidad natural:
  - activación de los macrófagos, PMN y NK
  - inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado
- Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.
- Intervención en la respuesta celular específica y en la reacción inflamatoria tanto aguda como crónica.
- Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea.
- Reparación tisular.

Las citoquinas siendo inespecíficas respecto del antígeno, pueden ejercer acciones de modo específico. <sup>(34)(35)(36)</sup>

Dentro de ellas tenemos:

- Regulación muy fina de los receptores de cada citoquina: los receptores se expresan en determinadas células una vez que éstos han interactuado con el antígeno.
- Requerimientos de contactos estrechos célula a célula: la citoquina sólo alcanza concentraciones adecuadas para actuar en el estrecho espacio que queda entre dos células interactuantes.
- Corta vida media de las citoquinas en sangre y fluidos: lo que asegura que sólo van a actuar en un estrecho margen de tiempo, en las cercanías de la zona donde se produjeron.

#### **4.8.4.3 INTERLEUQUINA 1 (IL - 1)**

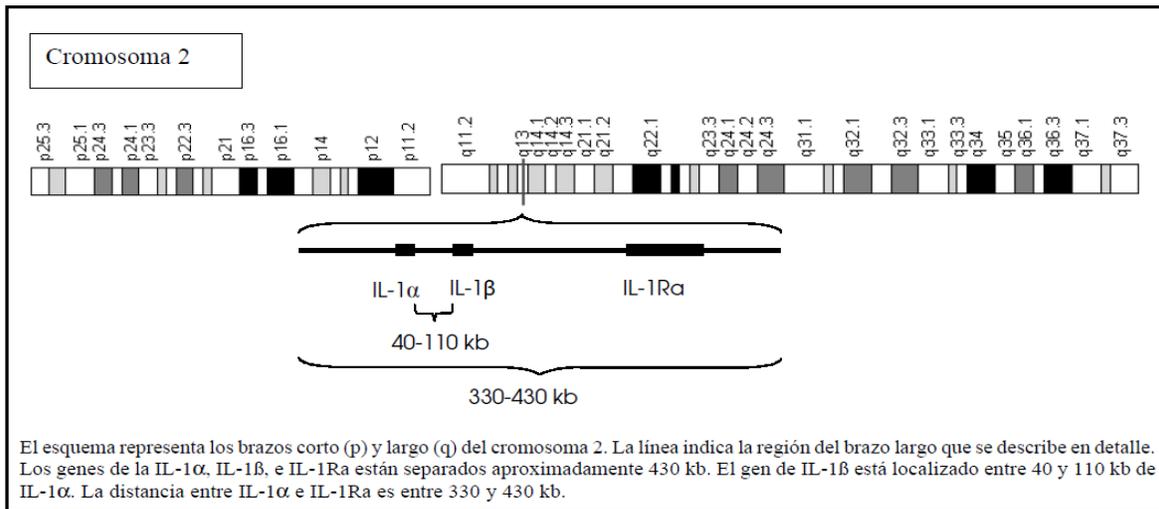
La principal fuente de esta interleuquina son los macrófagos activados y también por células dendríticas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, neutrófilos y células NK. <sup>(37)</sup>

Existen tres formas: <sup>(37)</sup>

- IL-1 $\alpha$ : Es mayormente intracelular y termina adherida a la membrana celular con ciertos efectos paracrinos en el entorno de la célula secretora.
- IL-1 $\beta$ : Es secretada a la circulación e interacciona con dos tipos de receptores:
  - Tipo I: se encuentran sobre la mayoría de las células del cuerpo y parece ser el mediador de las respuestas clásicas de la IL-1.
  - Tipo II: se encuentran sobre linfocitos B, neutrófilos, monocitos y células de la médula ósea.
- IL-1RA. Es inhibitoria sobre las otras dos formas actuando como antagonista impidiendo la unión de IL-1 $\alpha$  y  $\beta$  a sus respectivos receptores.

La IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aunque solamente tienen un 25 % de homología en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares.

Están localizados en el brazo largo del cromosoma 2, en la región 2q12-q21. Los genes de la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1RA están separados aproximadamente por 430 kb. Se estima que el gen de IL-1 $\beta$  está localizado entre 40 y 110 kb de IL-1 $\alpha$ . La distancia entre IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra es entre 330 y 430 kb. <sup>(37)</sup>



**Fig. 14 Cromosoma 2**

Fuente: Rev. Reumatología 2004;11(1): 11-39.

La producción de la IL-1 es inducida por productos bacterianos como el LPS y otras citoquinas como el: TNF, IL-2, IL-3, IL-12, CSF-GM, CSF-M, factor de células madre y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Otros inductores no microbianos de la secreción de IL-1 son: factores de daño tisular (hiperosmolaridad, isquemia), sustancias neuroactivas (sustancia P, anfetaminas), moléculas inflamatorias (proteína C reactiva, alfa-1-antitripsina, cristales de urato y de pirofosfato de calcio), factores de la coagulación (plasminógeno, trombina), lípidos (factor activador de plaquetas, LDL oxidasas) y algunos medicamentos como anfotericina-B y colchicina, entre otros. <sup>(35)(36)(37)</sup>

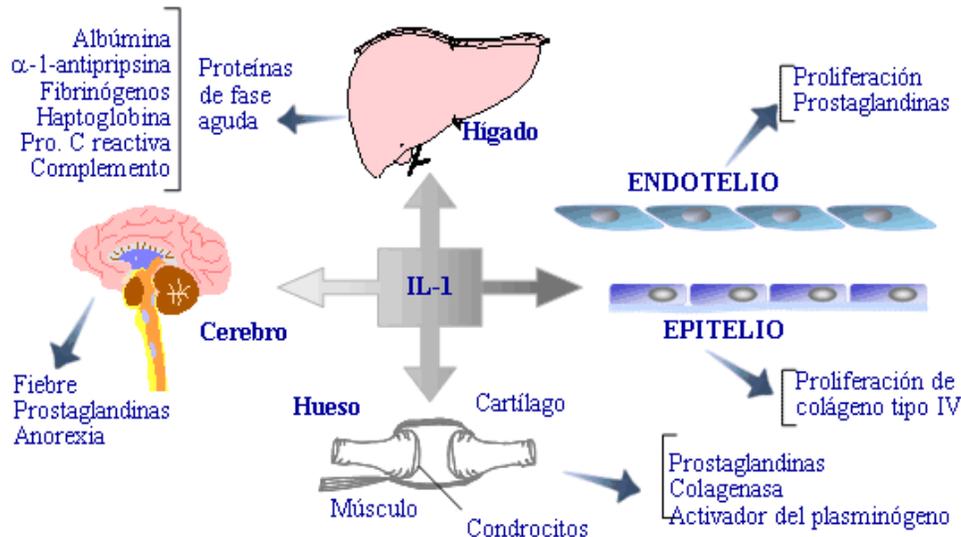


Fig. 15 Acciones Biológicas de la IL-1 sobre diferentes órganos del cuerpo

Fuente: <http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/inmunologia/tema09/etexto09.htm>

La IL-1 tiene acciones estimuladoras, así como inhibitorias, sobre diversos tipos de células e incluso promueve la apoptosis de otras. <sup>(38)(39)</sup>

Entre sus funciones principales están: <sup>(37)(38)(39)</sup>

- ✓ Efectos proinflamatorios, producto de la liberación de histamina por mastocitos, causando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de inflamación.
- ✓ A nivel local (foco inflamatorio): incrementa la proliferación de los linfocitos T CD4+, coestimuladores para la activación de las células T.
- ✓ Tiene actividad quimiotáctica sobre los granulocitos.
- ✓ Es un pirógeno causando fiebre por liberación de prostaglandinas.
- ✓ Junto con IL-6 causa elevación de las proteínas hepáticas de fase aguda (fibrinógeno y proteína C reactiva).
- ✓ Actúa sobre el sistema nervioso central produciendo sueño y anorexia durante procesos infecciosos por el efecto del óxido nítrico (NO). Ese mismo efecto inhibe la contracción de la musculatura lisa de las arterias y del músculo cardíaco.
- ✓ Estimula la liberación de hormonas de la hipófisis.
- ✓ Incrementa el número de células precursoras de la médula ósea.

- ✓ Promueve la expresión de los genes que la producen, así como de la síntesis de las prostaglandinas, leucotrienos, IL-8 y de ciertos protooncogenes como c-fos y c-jun.

#### **4.8.4.4 INTERLEUQUINA 8 (IL-8)**

Es sintetizada por todos los tipos de leucocitos y también por (fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, hepatocitos, células T activadas, queratinocitos en respuesta a una amplia variedad de estímulos. Debido a que IL-8 comparte similaridad de secuencias aminoácidas y de función con un grupo de citoquinas, éstas han sido agrupadas en una superfamilia de citoquinas pro-inflamatorias denominadas quimoquinas. <sup>(38)(39)</sup>

El gen de IL-8 se localiza en el cromosoma 4, comprende 4 exones y 3 intrones, esta codificada por un solo ARNm de aproximadamente 1.8 kb. La quimiocina se produce como una proteína de 99 aminoácidos, pero la forma activa se presenta como una proteína de 77 aminoácidos, como es el caso de la secretada por células endoteliales y hepatocitos mientras que los monocitos secretan principalmente una proteína de 72 aminoácidos. <sup>(38)(39)</sup>

Expresa su actividad biológica a través de dos receptores de alta afinidad:

- El receptor tipo I (IL-8RA) al que se une solo IL-8, la cual es específica.
- El receptor tipo II (IL-8RB) se une a IL-8, y también a otras quimioquinas.

La IL-8 es producida por diversos tipos celulares bajo un estímulo apropiado como el TNF, LPS, EROS entre otros, mientras que es inhibida con citocinas anti-inflamatorias o con agentes antioxidantes. <sup>(38)(39)</sup>

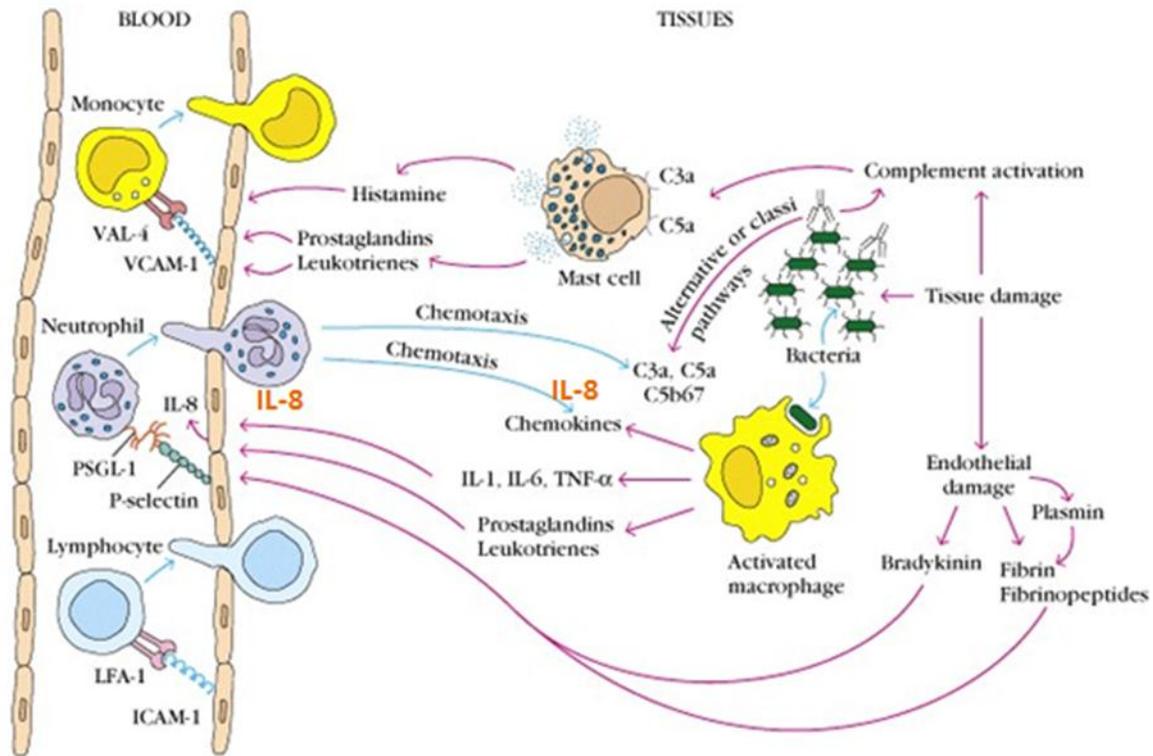


Fig. 16 Interleuquina 8. En el proceso Inflamatorio promueve la quimiotaxis y activación de neutrófilos

Fuente: [www.whfreeman.com/immunology](http://www.whfreeman.com/immunology)

Entre sus funciones principales están: <sup>(38)(39)</sup>

- ✓ Promueve la quimiotaxis, la acumulación y la activación de los neutrófilos en el sitio donde es producida, generalmente a una zona dañada; en este sitio los neutrófilos liberan el contenido de sus gránulos y fagocitan las células dañadas. <sup>(38)(39)</sup>
- ✓ Es un potente factor angiogénico, dado que las respuestas inflamatorias se inician con la migración de estas células hacia el foco inflamatorio, dirigidas por la acción de las quimiocinas, estas moléculas son altamente inducibles en una amplia variedad de células por estímulos proinflamatorios, como el LPS bacteriano, IL-1, TNF e IFN-γ. <sup>(38)(39)</sup>

#### 4.8.4.5 CITOQUINAS EN LA LEISHMANIASIS

Durante la leishmaniasis, las células de la respuesta innata producen una gran variedad de citoquinas, algunas relacionadas con un efecto protector como el TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1, el factor activador de la quimiotaxis del macrófago (MCAF) y la MIP1- $\alpha$  y  $\beta$ , que facilitan la activación de macrófagos y el desarrollo de una respuesta Th1. Otras tienen un efecto negativo para el huésped, como el TGF- $\beta$ , la IL-10, la IL-4 y la IL-13. <sup>(4)(39)(40)</sup>

Las citoquinas mencionadas anteriormente pueden ser inducidas directamente por el parásito o por células vecinas, como macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células NK, a través de receptores y de otras citoquinas. Sin embargo, el parásito puede tener un papel adverso al inhibir la síntesis de citoquinas protectoras como la IL-12, el IFN- $\gamma$ , la IL-1, el TNF- $\alpha$ , el p10-IFN- $\gamma$  inducible (IP-10) y la MIP-1  $\alpha$  y  $\beta$ , y al promover la síntesis de un supresor de genes de citoquinas, que inhibe la transducción de señales de IFN- $\gamma$  e IL-12. El parásito, para asegurar su supervivencia, puede alterar el funcionamiento del sistema inmune, en este caso la producción de citoquinas. <sup>(4)(39)(40)</sup> Durante la infección por *Leishmania* se produce una amplia variedad de citoquinas, entre ellas las producidas por células de la respuesta innata. Estas citoquinas influyen sobre diversas poblaciones celulares y generan el microambiente necesario para el desarrollo de resistencia o sensibilidad a la infección. <sup>(4)(39)(40)</sup>

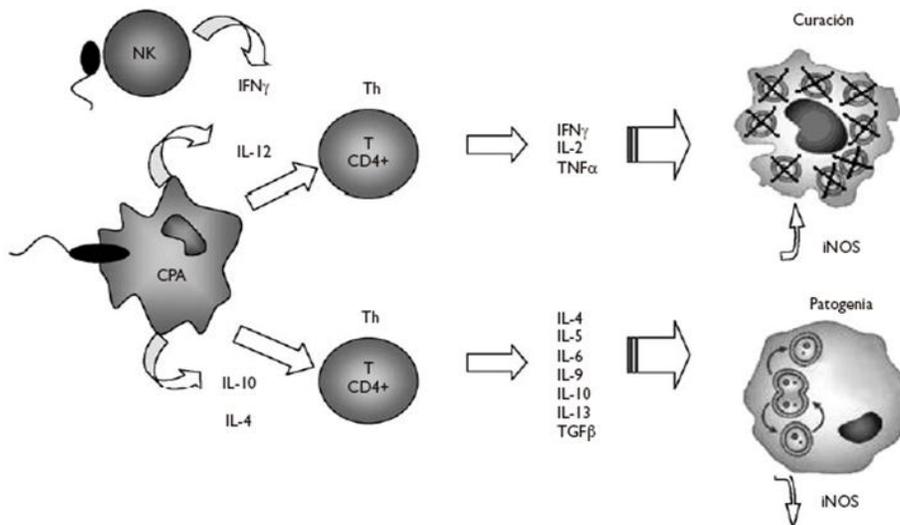


Fig.17. Interleuquinas en la reacción inmunitaria a *Leishmania*

Fuente: Salud Pública de México 2006; 48(5): 430-439.

## 4.9 DIAGNOSTICO

Existen dos métodos de diagnóstico directo e indirecto. <sup>(1)(20)(31)</sup>

Los métodos de diagnóstico directo que nos permiten observar al parásito en algunas de sus formas evolutivas, estos son los más fidedignos. Se realiza un frotis de la lesión, aplicando luego una tinción Panóptica, Giemsa o Romanowsky.

Los métodos directos incluyen

- Diagnóstico molecular: consiste en detectar el DNA del parásito en muestras de lesiones o sangre periférica y amplificado mediante el PCR. <sup>(1)(20)(31)</sup>

Los métodos indirectos incluyen

- Intradermorreacción de Montenegro
- Serología: búsqueda de anticuerpos mediante Inmunofluorescencia indirecta, ELISA, Inmunocromatografía. Se debe considerar que puede haber reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas. <sup>(1)(20)(31)</sup>

## 4.10 TRATAMIENTO

El tratamiento para la leishmaniasis está basado principalmente en componentes antimoniales pentavalentes. Los cuales son altamente tóxicos, difíciles de administrar y requieren de un control clínico cercano. <sup>(1)(31)(41)(42)</sup>

De acuerdo al tipo de leishmaniasis tenemos los siguientes tratamientos:

- Leishmaniasis Cutánea: antimoniales pentavalentes (glucantime, pentostam) 20mg/7kg/día, durante 20 días. <sup>(1)(31)(41)(42)</sup>
- Leishmaniasis Mucosa: Anfotericina B 50 mg diluidos en 500 mL de dextrosa al 5%. Este medicamento es altamente toxico y debe ser controlado en un centro hospitalario, asociado a corticoides para disminuir los efectos colaterales. <sup>(1)(29)(39)</sup>
- Leishmaniasis Visceral: Antimoniales pentavalentes 20 mg/kg/día, vía intramuscular, durante 30 días. <sup>(1)(31)(41)(42)</sup>

Es importante el estudio de nuevas alternativas de tratamiento para la leishmaniasis, tal es el caso de la medicina tradicional utilizado para mitigar enfermedades; como ser la Evanta, la cual es utilizada para el tratamiento de la leishmaniasis en Bolivia y otras enfermedades parasitarias.

## 5. EXTRACTO DE ALCALOIDES DE EVANTA

La planta de nombre *Galipea Longiflora Krause* (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) *Kallunki*) tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre *vernacular de Evanta*. Es un árbol de 2 a 3 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un pecíolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos. En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales andinos en los departamentos del Beni y La Paz. El uso tradicional más frecuente de la Evanta 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 como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones durante tres días. Este género cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y el Sur de Brasil. <sup>(5)(43)(44)</sup>

**Tabla N° 3**  
**Clasificación taxonómica de *Galipea longiflora***

Reino	Vegetal
División	Magnoliophita
Subclase	Rosidea
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Genero	<i>Galipea</i>
Especie	<i>Longiflora krause</i>
Sinonimo	<i>Angostura longiflora</i> (Kallunki y pirani, 1998)
Nombre común	Evanta

Fuente: Salamanca Efraín, 2008.

Entre los años 1985-1991, un grupo de investigadores Franco-Boliviano, que trabajaban en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), La Paz, Bolivia, confirmaron la actividad antiparasitaria, de los extractos de la especie Evanta, planta medicinal antiparasitaria utilizada por el pueblo Tsimane. Un total de 12 alcaloides quinolínicos, fueron aislados e identificados de las hojas, raíces y corteza de tronco de esta especie. Algunos de los principios activos aislados de las hojas de esta especie, resultaron ser nuevas estructuras y debido a la eficacia demostrada y la baja toxicidad determinada en modelos *In vivo* fueron patentados (Chimaninas A, B, C y D). <sup>(5)(43)(44)</sup>

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, desde 1993 ha ido realizando trabajos sobre la evaluación biológica de especies medicinales listadas en Farmacopeas Tradicionales a través de proyectos multidisciplinarios. Sobre la base de extractos de Evanta, planta medicinal antiparasitaria conocida por las etnias: Tacana, Mosekene y Tsimane, asentadas en la Amazonía Boliviana. Esta especie ha sido seleccionada de entre más de 800 extractos que han sido evaluados por su actividad antiparasitaria *In vitro* en la última década. <sup>(5)(43)(44)</sup>

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). <sup>(5)(43)(44)</sup>



**Fig. 18** *Galipea longiflora* Krause

Fuente: I.I.F.B.

Para la obtención del extracto de alcaloides de Evanta, los investigadores realizaron la colecta de árboles de Evanta, de la Comunidad Tacana de Santa Rosa, Provincia Abel Iturralde, La Paz, Bolivia, cuya identificación taxonómica la realizaron mediante comparación, con las muestras vaucher (AS49 y SD17) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia. <sup>(5)(43)(44)</sup>

## **5.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

### **5.1.1 EXTRACCIÓN CONTINÚA**

Utilizaron dos equipos de extracción continua (soxhlet), tomaron 25 gramos de la corteza y 25 gramos de las hojas, molieron finamente y la extracción lo realizaron con 250 mL de Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) por 2.5 horas. Los extractos que se obtuvieron por rotaevaporación (120rpm y 40°C), fueron secados con bomba de alto vacío, hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 3.7% (corteza) y 3.1% (hojas), con relación al peso seco de la planta. <sup>(5)(43)</sup>

### **5.1.2 MACERACIÓN**

El material vegetal seco finamente molido lo maceraron por 3 días en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10L x 3 veces), en percoladores cónicos de acero inoxidable (diámetro inferior 22 cm x diámetro superior 42 cm x 74 cm de alto). El extracto fue filtrado y concentrado a 40°C y el secado lo hicieron con una bomba de alto vacío hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 4.6% (corteza) y 3.9% (hojas), con relación al peso seco de la planta. <sup>(5)(43)</sup>

### **5.1.3 OBTENCIÓN DE ALCALOIDES TOTALES**

Del extracto crudo que obtuvieron, tomaron 50 gramos y lo disolvieron en 100 mL de Diclorometano y sometieron a lavados sucesivos con 100 mL de HCl 1N (3veces, c/u por 30min. sobre agitador magnético). Los lavados ácidos lo controlaron con un espectrofotómetro UV, combinados y llevados a precipitación completa con 150 mL de NaOH 2N. El sólido formado fue extraído con 100 mL de Diclorometano (3veces). La solución orgánica fue deshidratada con NaSO<sub>4</sub>, filtrada, evaporada al vacío y secada con una bomba de alto vacío hasta peso constante. Los rendimientos que obtuvieron fue del 2.0% (corteza) y 0.57% (hojas). <sup>(5)(43)</sup>

### **5.1.4 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LA CORTEZA**

De los alcaloides totales tomaron 17.6 gramos y lo disolvieron en 70 mL de Diclorometano, al cual adicionaron 65 gramos de Sílica gel. La muestra fue secada utilizando rotaevaporador y fue sometida a alto vacío por 30min. Este material lo utilizaron como cabeza en la columna VLC (10cm diámetro x10cm alto), con 275 gramos Sílica gel. La columna fue eluída (bajo vacío) con Tolueno (Fracción 1); Tolueno-dietil eter (Fracción 2); Tolueno-dietil eter (Fracción 3, 4) y Tolueno-metanol (Fracción 4). Las Fracciones 1 y 2, la controlaron por TLC (solvente A), unidas y sometidas a cristalización con n-hexano caliente, para obtener la 2-fenilquinolina (1) (51%, con relación al peso de alcaloides totales). Las fracciones que obtuvieron de la corteza fueron identificadas por TLC-MS, que confirmaron la presencia de los alcaloides 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. <sup>(5)(43)</sup>

### 5.1.5 PURIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LAS HOJAS

La purificación de los principios activos a partir de los extractos totales de hojas, lo realizaron siguiendo los mismos procedimientos de la corteza. Obteniendo de la Fracción 1, mediante cristalización con n-hexano caliente, la 2-fenil-quinolina (30%, con relación al peso de alcaloides totales). Las Fracciones de las hojas también las analizaron por TLC-MS, en donde encontraron como alcaloides mayoritarios a las moléculas 1, 3, 4, 8, 9 y 10 y como alcaloides minoritarios los compuestos 7 y 11 detectados por MS de alta resolución. <sup>(5)(43)</sup>

**Tabla N°4**

**Rendimientos y actividad leishmanicida *In vitro* de alcaloides quinolínicos aislados de corteza del tronco, hojas, corteza y raíz de *Galipea longiflora*.**

Productos	Corteza %	Hojas %	Raíz %	CI <sub>90</sub> (µg/mL)
2-fenilquinolina	47.7	29	66.7	100 <sup>a,b,c</sup>
2-fenil-4-metoxi-quinolina	2.8		3.3	50 <sup>a,b,c</sup>
2-(3', 4'-dimetoxifeniletil)-quinolina	1.1			100 <sup>a,b,c</sup>
2-(3', 4'-metilendioxfeniletil)-quinolina	10.2		6.7	100 <sup>a,b,c</sup>
2-(3', 4'-metilendioxfeniletil)-4-metoxi-quinolina (cusparina)	3.1		2	100 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -pentil-4-metoxi-quinolina	1			100 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -pentilquinolina	2.4		17.3	100 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -propilquinolina	1.3	12.5		50 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -propil-4-metoxi-quinolina (Chimanina A)	2.4			100 <sup>a,b,c</sup>
2-(E)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina B)		16.7		25 <sup>a,b,c</sup>
2-(1', 2'-trans-epoxipropil)-quinolina (Chimaina D)		1.7		25 <sup>a,b,c</sup>
2-(E)-prop-1'-enil-4-metoxi-quinolina (Chimanina C)		0.5		
Shiquimianina		1.7	4	100 <sup>a,b,c</sup>

CI<sub>90</sub>= a) *L. braziliensis* (2903); b) *L. amazonensis* (PH8) y (H-142); c) *L. donovani* (2682) y (HS-70).

Fuente: Salamanca Efraín, 2008.

### III. ANTECEDENTES

El uso de las plantas medicinales reportada según la medicina tradicional, es un paso muy importante que debemos asumir. En este sentido el uso de plantas medicinales como un tratamiento alternativo para diferentes enfermedades, está siendo ampliamente estudiada. Tal es el caso del extracto total de alcaloides de Evanta (EAE) contra la leishmaniasis.

La especie medicinal *Galipea longiflora* (*Angostura longiflora* Krause), conocida con el nombre de Evanta, está registrada en las farmacopeas tradicionales como una planta medicinal para la cura de la “lepra blanca” como se conoce a la leishmaniasis. Esta planta es usada de manera tradicional por las etnias Tacana, Mosekene y Tsimane y el uso tradicional más frecuente según los Tacanas para el tratamiento de la leishmaniasis, es moler la corteza fresca o seca para luego ser aplicada directamente en las úlceras como cataplasma, dos veces al día hasta que sane, además de beber la cocción. <sup>(5)(43)(44)</sup>

El Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA) dependiente de la Facultad de Medicina de la UMSA, estudiaron la actividad antiparasitaria de los extractos de Evanta. De las hojas, raíces y corteza, se aislaron e identificaron 15 alcaloides quinoléicos. Algunos de estos alcaloides presentes en las hojas resultaron ser eficaces *In vivo* y con baja toxicidad; por lo que fueron patentados como (Chimaninas A, B, C y D). <sup>(5)(43)(44)</sup>

Esta planta ha sido estudiada desde el año 1993, en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura conjuntamente con el Instituto de Francia (ORSTOM), donde se han desarrollado estudios en ratones Balb/c infectadas con *L. amazonensis* o *L. venezuelensis*, tratándolas con un alcaloide quinoleínico (100 mg/Kg/día) y también con glucantime (56 mg/Kg/día); donde la 2-n-propilquinolina y la chimanina B fueron más potentes que el glucantime y además redujeron la severidad de las lesiones. <sup>(45)</sup>

Según el estudio realizado por Fournet y colaboradores; se infectaron ratones Balb/c con *L. amazonensis* y se trataron con el extracto total a un grupo y con diferentes alcaloides de Evanta a los otros grupos. Mostrando que el tratamiento con chimanina B (50mg/kg), redujo el tamaño de la lesión en un 74% y la carga parasitaria en un 90% comparado con el control. La 2-n-propilquinolina (50mg/kg) redujo la carga parasitaria de la lesión en un 88%, mientras que la 2-fenilquinolina (50mg/kg, el mayor alcaloide) suprimió la carga parasitaria en un 94%, la chimanina D en un 84% y el tratamiento con el extracto total fue en un 95%. El tratamiento con el glucantime (28mg/kg/día, vía subcutánea) redujo la carga parasitaria en un 96%.<sup>(46)</sup>

Otros estudios realizados en el Instituto de investigaciones fármaco-bioquímicas (IIFB), determinaron *In vitro* la actividad antiparasitaria del extracto total de alcaloides de Evanta sobre promastigotes y amastigotes axenicos de *L. amazonensis* y *Leishmania spp.* Usando un método colorimétrico, basado en la reducción de la sal de tetrazolium a una forma soluble formazan, se obtuvo valores de IC<sub>50</sub> entre 26,9 – 40,5 µg/mL del extracto total frente a 8 cepas de *Leishmania* (promastigotes) y una actividad antiparasitaria (amastigotes axenicos) IC<sub>50</sub> = 23,1 ± 0,4 µg/mL; siendo menor al glucantime IC<sub>50</sub> = 30 ± 6 µg/mL. Mostrando una buena actividad antiparasitaria del EAE frente a los amastigotes presentes en una lesión ulcerada, que son los responsables de la patología, considerando así la aplicación tópica del EAE.<sup>(47)</sup>

De tal forma se han llevado a cabo diferentes estudios científicos que han mostrado que el extracto crudo de Evanta tiene actividad anti-leishmanicida y en el área de inmunología del instituto Seladis, perteneciente a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas UMSA; se han desarrollado estudios acerca de la influencia de este extracto sobre la respuesta inmune, midiendo diferentes moléculas, que nos brinden una mejor información sobre la respuesta inmune frente a la leishmaniasis.

Se han realizado estudios acerca del efecto de los alcaloides de Evanta sobre la proliferación celular y la producción de citoquinas; utilizando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con leishmaniasis cutánea y controles. Estas células se cultivaron con el antígeno de *L. braziliensis*, donde los pacientes sin tratamiento respondieron fuertemente a la proliferación celular comparada con el control. Al utilizar el activador policlonal Concanavalina A (Con A), los pacientes respondieron a la proliferación de forma similar al control. También se comparó la respuesta proliferativa de pacientes tratados con Evanta vs Glucantime, encontrándose valores menores al promedio del grupo sin tratamiento. En cuanto a la producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$ ), se observó una diferencia significativa en aquellas cultivadas con el antígeno *L. braziliensis*, pero no así en las estimuladas con la Con A. Excepto INF- $\gamma$  ya que presentó un valor similar al promedio de los pacientes sin tratamiento; en cambio los tratados con Glucantime presentaron un valor mayor en comparación con la Evanta. Sugiriendo que los pacientes tratados con Evanta presentan una mejor regulación de la respuesta inmune que Glucantime, ya que se observó una reducción de la proliferación celular y la producción del IFN- $\gamma$ , que podrían contribuir al control de la reacción inflamatoria. <sup>(48)</sup>

En otro estudio, ratones hembras de la cepa Balb/c se inmunizaron con el antígeno total de *L. braziliensis*, después fueron tratadas con el extracto total de alcaloides de Evanta. Se aislaron linfocitos T del bazo, sobre las cuales se analizó la proliferación celular y la capacidad de producción de IFN- $\gamma$ . Los resultados mostraron inhibición de la proliferación celular, tanto en células estimuladas Con A como en aquellas estimuladas con el antígeno de *Leishmania*. Se observó una inhibición dosis–dependiente (a > dosis del extracto > el efecto inhibitor de la proliferación celular). En la producción del IFN- $\gamma$  se observó también el mismo efecto (a mayor dosis, mayor inhibición) tanto en células estimuladas por Con A como en las células estimuladas con el antígeno total de *L. braziliensis*. Resultados que apoyan que la Evanta además de actuar sobre el parásito por su efecto leishmanicida, actúa también modulando la respuesta inmune. <sup>(49)</sup>

El estudio acerca del efecto de EAE sobre macrófagos murinos infectados con *L. braziliensis In vitro*; mostro que el EAE a las 24 horas disminuye un 44,6 % la capacidad infectiva de *L. braziliensis* en sus dos estadios Amastigote y Promastigote. Los macrófagos tratados con Evanta presentaron un porcentaje de (6%) e índice de fagocitosis de 1,2 bajos en comparación con los macrófagos que no fueron tratados. También la Evanta mantuvo la capacidad microbicida del macrófago a las 72 horas postinfección atenuando los mecanismos de evasión del parásito. <sup>(50)</sup>

Es importante recalcar los estudios realizados sobre la respuesta inmune en Suecia. <sup>(51)(52)(53)</sup> Donde se observó la curación de ratones infectados gracias a la planta, lo que podría indicar que los alcaloides de Evanta tendrían una acción directa sobre el parásito y sobre la respuesta inmune. Se demostró que el EAE mata directamente al parásito a una dosis de 10 µg/mL, a esta baja concentración el EAE no tiene un efecto sobre la viabilidad y proliferación de las células eucariotas. El extracto total de Evanta mostro un efecto inhibitorio más fuerte que la 2-fenilquinolina sobre el crecimiento del parásito. El extracto no estimulo directamente a las células T o B ni macrófagos J774. Sin embargo interfirió en la activación de las células T de ratones y humanos, mostrado por la reducción de la proliferación celular *In vitro* y la producción de IFN-γ. El efecto fue más evidente cuando las células fueron pretratadas con EAE y seguidamente fueron estimuladas con el activador policlonal de células T Con A y anti- CD3. Estos resultados sugieren que la Evanta tiene un efecto leishmanicida directo y el efecto sobre la producción IFN-γ podría contribuir al control de la reacción inflamatoria crónica, característica de esta patología. <sup>(51)</sup>

Se investigó si EAE podría interferir con la activación del linfocito antígeno-especifico. Evidenciando que el tratamiento tanto *In vitro* como *In vivo* reduce la respuesta del linfocito, medido por la producción del IFN-γ (reducción del 55% y 63% comparada con las células no tratadas), así mismo la producción de IL-12 y TNF fueron suprimidas. No se observó algún efecto del antimonio pentavalente

glucantime (SbV), que es el tratamiento convencional contra la leishmaniasis. De igual forma la carga parasitaria también fue reducida pero fue menor en las tratadas con SbV. También se ha realizado un tratamiento combinado del EAE y SbV que controlaron mejor el tamaño de la lesión y la carga parasitaria haciéndola una lesión más pequeña durante el curso de la infección, comparada con el tratamiento solo de EAE y SbV. <sup>(52)</sup>

Se analizó el efecto de EAE y el purificado del alcaloide 2-fenilquinolina (de mayor porcentaje de la Evanta) sobre la activación de células dendríticas humanas y su habilidad para estimular células T CD4+ halógenas. La expresión de moléculas de activación en la superficie de células dendríticas estimuladas con EAE y 2-fenilquinolina no fue afectada, tampoco la expresión de moléculas de activación en la superficie de células T CD4+ halogenicas. Se comparó con el control la secreción de IL-12p40, IL-23 e IL-6, la cual fue menor en DCs-EAE, DCs-2-ph y células T CD4+ halógenas co-cultivadas con CDs; se secretaron niveles bajos de IFN- $\gamma$  e IL-10 pero niveles similares de IL-17. Estos resultados demuestran que el EAE y 2-fenilquinolina afectan la estimulación de CDs y su habilidad para estimular células T CD4+ halógenas, reduciendo la producción de IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-6 e IL-23. Sugiriendo que el EAE y 2-fenilquinolina puede tomar parte en la regulación de la inflamación. <sup>(53)</sup>

Existen diferentes estudios que confirman las bondades de las plantas medicinales como cura de las enfermedades a nivel mundial. Para la leishmaniasis se han realizado estudios en Colombia de extractos y fracciones de las especies vegetales *Piper cumanense* y *Piper holtonii*, cuyo nombre común es cordoncillo (rica en esteroides y terpenos glicosilados), evidenciando un efecto leishmanicida en macrófagos murinos J774 infectados con *L. panamensis*. Otros estudios, reportan que el extracto etanólico de hojas de *Piper betle* ejerce su actividad leishmanicida, a través de la inducción de apoptosis en promastigotes y amastigotes de *L. donovani*. <sup>(54)</sup>

Otro estudio de extractos y compuestos de plantas colombianas de las familias *Lauraceae* y *Rutaceae* (corteza, tallo y hojas); ricas en alcaloides, triterpenos, esteroides, lignanos, felinpropenos y benzenoides. Se aislaron y evaluaron 25 sustancias y de ellas 2 presentaron actividad leishmanicida sobre promastigotes y amastigotes de *L. panamensis*: los extractos etanólicos de hojas *O. macrophylla* y corteza de *Z. monophyllum (berberina)*, conocido comúnmente como Tachuelo, también reducían el porcentaje de células infectadas. <sup>(55)(56)</sup>

Se estudió la actividad de alcaloides de *Ervatamia coronaria*, perteneciente a la Familia Apocynaceae (conocida como clavel de la India) sobre macrófagos de la línea celular J774 infectados con amastigotes de *L. braziliensis* a diferentes concentraciones (1, 10, 20, 25, 50 e 100 µg/mL). Comparando los resultados con otros estudios; se observó que estos alcaloides mostraron una mejor eficacia, con inhibición del 67.6% a 10 µg/mL a una hora post-infección y del 83% en el tratamiento durante 3 días en la misma concentración. <sup>(57)</sup>

Se evaluó la actividad leishmanicida y la toxicidad del extracto hidroalcohólico de los tallos de *Croton alnifolius* de la familia Euphorbiaceae ricos en: flavonoides, taninos, fenoles, esteroides, alcaloides y quinonas. Se infectaron hamsters con promastigotes de *Leishmania peruviana* y después de tres semanas se las trataron con el extracto, se contrastó con el grupo tratado con glucantime. El extracto presentó una actividad leishmanicida similar al glucantime, promoviendo su uso como un tratamiento alternativo. La dosis letal media fue (DL<sub>50</sub>) de 1396,1 mg/kg, ligeramente tóxico. <sup>(58)</sup>

Otro estudio del aceite esencial de *Matricaria chamomilla*, perteneciente a la familia Asteraceae, una planta conocida como “manzanilla”, presenta actividad leishmanicida. Mostró ser activo contra amastigotes intracelulares de *L. panamensis* y *L. braziliensis* (CE<sub>50</sub> de 2,87 y 10,30 µg/mL). Sin embargo no mostró actividad contra las formas axénicas de *L. braziliensis*. Resultados que sugieren ser un candidato potencial para el desarrollo de medicamentos. <sup>(59)</sup>

Los Flavonoides: Luteolin y Quercetin aislados del *Vitex negundo* (familia Verbenaceae) y *Fagopyrum esculentum* (familia Polygonaceae), conocida como alforfón; son potentes leishmanicidas sobre amastigotes intracelulares de *L. donovani* con IC50 de 12.5 y 45.5  $\mu$ M. El tratamiento de promastigotes con flavonoides reducen la carga parasitaria del bazo de roedores en un 80% (3.5 mg/kg de peso).<sup>(60)(61)</sup>

De las Naphtoquinonas, el Plumbagin extraído de *Pera benensis* (familia Euphorbiaceae) mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de promastigotes de *L. donovani* y amastigotes intracelulares. El tratamiento local fue tan potente como el glucantime.<sup>(60)</sup>

Taxoides, 10-Deacetylbaocatin III aislado de *Taxus baccata* (Taxaceae), planta conocida como tejo negro, mostraron una fuerte actividad leishmanicida en contra de amastigotes intracelulares de *L. donovani*, además de inhibir moderadamente el crecimiento de promastigotes. También estimularía la producción de óxido nítrico en macrófagos que ayudaría a su actividad leishmanicida.<sup>(60)</sup>

Las Saponinas aislados de *Maesa balansae* (Myrsinaceae) mostraron una fuerte actividad leishmanicida contra amastigotes intracelulares de *L. infantun*. El extracto redujo la carga parasitaria del hígado en un 95% en ratones Balb/c.<sup>(60)</sup>

De los Monoterpenos, el Linalool extraído de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae), exhibe una fuerte actividad leishmanicida en contra de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, observándose una reducción del 50% en la interacción del macrófago y el parásito, asociado con un incremento de la producción de óxido nítrico, destruyendo el 100% de ambos promastigotes y amastigotes intracelulares sin observarse algún efecto citotóxico.<sup>(60)</sup>

Dentro de los Iridoides, el Amarogentin aislado de *Swertia chirata* (Gentianaceae), demostró una buena eficacia en el tratamiento de hamsters infectados con *L. donovani*, reduciendo la carga parasitaria en el bazo en un 90%, sin evidenciarse alguna toxicidad.<sup>(60)</sup>

La infección por *Leishmania* generalmente induce una respuesta inmune muy compleja que varía dependiendo de diferentes factores: según la forma clínica de la enfermedad, la especie de *Leishmania* implicada en el proceso infeccioso y la cronicidad de la enfermedad. Respuesta inmune que incluyen desde mecanismos de inmunidad inespecífica, hasta mecanismos de inmunidad específica mediada por células o anticuerpos. Los eventos que median el proceso de infección influyen en la eliminación del parásito o en el desarrollo de la enfermedad, a través de la inducción o no de una respuesta inmune específica efectiva que lleve a la activación de la célula hospedera, muerte y destrucción del parásito. <sup>(62)(63)</sup>

Existen diferentes estudios que han predominado en la respuesta inmune específica principalmente sobre los macrófagos, células hospederas de la *Leishmania*. Sin embargo es importante mencionar que las células de la respuesta inmune innata son las que entran primeramente en contacto con el parásito. Dependiendo de cómo se monte la respuesta inmune innata y del microambiente se resolverá o aumentará la severidad de la enfermedad, dando lugar a la respuesta inmune siguiente. Una de las primeras células en llegar al sitio de la infección son los neutrófilos, células que hoy en día están siendo estudiadas. <sup>(62)(63)</sup>

Los neutrófilos son las primeras células que llegan al sitio de infección; según estudios realizados en ratones, casi el 100% de las células infiltradas después de la infección son PMN (neutrófilos) y después de 2-3 días es reemplazado por los macrófagos, disminuyendo los neutrófilos a la mitad a los 12 días después de la infección. Estas células son rápidamente y masivamente reclutadas para eliminar al agente extraño por medio de la fagocitosis, acciones de gránulos citoplasmáticos (MPO), además induce la secreción de interleuquinas (IL-8, IL-1), por lo que deben estar en cantidades óptimas para combatir la infección y poder eliminar al parásito. <sup>(63)(64)(65)(66)(67)(68)</sup>

En ciertos estudios con ratones Balb/c infectados con *L. braziliensis*; se evidenció que la eliminación del parásito va a depender de las acciones del neutrófilo, seguidamente del macrófago asociado con la secreción del INF- $\gamma$  y otras interleuquinas, así como también la participación de mecanismos microbicidas, producción de especies reactivas de oxígeno (EROS). <sup>(67)(68)(69)(70)</sup>

Los neutrófilos aislados de ratones Balb/c después de las cuatro horas de ser reclutadas al sitio de inflamación, albergaron menos cantidad de parásitos con altas concentraciones de óxido nítrico, sugiriendo que el NO producido por los neutrófilos pueden ayudar a controlar la infección de *Leishmania* en la etapa temprana de la enfermedad. Sin embargo se ha evidenciado que algunas especies de *Leishmania* exhiben resistencia a EROS disminuyendo su producción por las células, como es el caso de *L. amazonensis*. <sup>(67)(68)(69)(70)</sup>

Los resultados compilados en esta revisión señalan que los neutrófilos tienen un rol crítico en el proceso de establecimiento de la infección por *Leishmania*; ya sea mediando la contención en los hospederos resistentes, o por el contrario, facilitando un acceso “seguro” a los macrófagos de los hospederos susceptibles. Por otro lado, también indican que la influencia inmunológica de los neutrófilos va más allá de lo que tradicionalmente se ha descrito en la Respuesta Inmune Innata, con la liberación de mediadores celulares (citoquinas y quimioquinas) que promueven o limitan la activación de macrófagos y linfocitos, componentes de la Respuesta Inmune Adquirida. <sup>(63)(64)(65)(66)(67)(68)(69)(70)(71)</sup>

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La leishmaniasis es una problemática creciente de salud pública a nivel Mundial y Nacional puesto que no se le da una importancia a la atención y control de la misma. Según la OMS es una enfermedad emergente y olvidada presente en 88 países del mundo, causante de una mortalidad considerable a nivel mundial, afectando a millones de personas cada año. Se cree que alrededor del mundo hay 12 millones de personas afectadas, reportándose entre 1,5 - 2 millones de nuevos casos cada año.

En Bolivia entre el año 1983-2006 fueron registrados 35714 casos y en el año 2007 se registraron 3153 casos; de los cuales 1753 casos corresponden al departamento de La Paz, seguido por Beni, Pando, Cochabamba y Santa Cruz; En nuestro país el número de casos se ha incrementado de 120 casos reportados en 1982 a 3153 casos en el 2007. Afectando principalmente al departamento de La Paz seguido por Beni, Pando, Cochabamba, Santa Cruz, Tarija y Oruro.

El tratamiento contra esta enfermedad, está basado principalmente en componentes antimoniales pentavalentes (Glucantime) y anfotericina B. Algunos pacientes no responden al tratamiento o el parásito muestra resistencia. Estos fármacos son altamente tóxicos, ocasionando diversos efectos colaterales, reflejados en el dolor, diarrea, fiebre, mialgias, dolores articulares, trastornos cardiacos que pueden causar arritmias graves e incluso un paro cardiaco; también se puede presentar problemas gastrointestinales, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. Siendo necesaria en muchos casos la hospitalización de los pacientes. Además estos fármacos son de un elevado costo, que a veces los hace inaccesibles para las personas de bajos recursos. Esta enfermedad ocasiona lesiones que comprometen la piel, mucosas, y vísceras, cuyo daño puede ser irreversible para la persona infectada.

Todo lo mencionado anteriormente, demanda esfuerzos dirigidos a desarrollar un tratamiento alternativo contra la leishmaniasis, que no presente efectos colaterales y que puedan ser accesibles a la población infectada.

## V. JUSTIFICACIÓN

Los problemas que presenta actualmente el tratamiento convencional contra la leishmaniasis, hace que se busquen nuevas alternativas, investigando en especial en la medicina tradicional. Existen diferentes plantas a nivel mundial que han demostrado su actividad leishmanicida, ricas en alcaloides, terpenos y otros. En nuestro país se está estudiando al extracto total de alcaloides de Evanta; una planta medicinal encontrada en los departamentos de La Paz y Beni y en otros países como Brasil, Guatemala y Cuba. Tiene propiedades beneficiosas: es de menor toxicidad y no necesita de una administración parental. Según la medicina tradicional la corteza fresca o seca de la Evanta es molida y aplicada directamente sobre las lesiones o también puede ser por vía oral (a través de infusiones). Además tendría un menor costo por lo que sería más accesible a la población que sufre de la enfermedad.

Basados en que el extracto total de Evanta tiene actividad leishmanicida, ya sea por su acción directa sobre el parásito, también podría deberse a su influencia sobre la respuesta inmune de la persona infectada contra el parásito. La infección por leishmaniasis induce una respuesta inmune muy compleja; donde participan diferentes células del sistema inmune, aunque los macrófagos son las células responsables de la eliminación final del parásito. Los neutrófilos son las primeras células que llegan al sitio de infección (son rápidamente y masivamente reclutadas) listas para combatir la infección, mediante la fagocitosis, mecanismos microbicidas y también sintetizando diferentes factores e interleuquinas. Siendo la primera línea de defensa, ejerce un rol importante en la eliminación del parásito y el direccionamiento de la respuesta inmune siguiente.

Los estudios que involucren un tratamiento alternativo y la respuesta inmune innata (neutrófilos) en la leishmaniasis hasta la fecha son muy pocos.

Razón por la cual el presente estudio pretende evaluar el efecto *In vivo* del extracto de alcaloides de Evanta sobre la actividad de neutrófilos en modelo murino.

## **VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál será el efecto *In vivo* del extracto de alcaloides de Evanta sobre la actividad de neutrófilos en modelo murino?

## **VII. OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Evaluar *In vivo* el efecto del extracto de alcaloides de Evanta sobre la actividad de neutrófilos en modelo murino.

### **2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ✓ Evaluar la fagocitosis por neutrófilos provenientes de ratones tratados con el extracto de alcaloides de Evanta.
- ✓ Evaluar la producción de óxido nítrico por neutrófilos provenientes de ratones tratados con el extracto de alcaloides de Evanta.
- ✓ Evaluar la producción de IL-1 e IL-8 por neutrófilos provenientes de ratones tratados con el extracto de alcaloides de Evanta.

## **VIII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Animales de Experimentación

### **2. DESCRIPCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA**

Se trabajó con 36 ratones hembras de la cepa Balb/c de aproximadamente 8 semanas de vida y un peso aproximado de 18 a 20 gramos.

### **3. CONTEXTO Y LUGAR**

El estudio se realizó en el laboratorio de Inmunología del Instituto Seladis y el Bioterio, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA.

### **4. ASPECTOS ETICOS**

Para los estudios de investigación, se han desarrollado modelos de animales que permiten evaluar enfermedades genéticas humanas y producir drogas o vacunas; también se han utilizado como fuente donante de células y órganos, así como proteínas sanguíneas o anticuerpos.

Dentro del estudio se tomó en cuenta lo siguiente:

a) La persona a cargo del estudio se capacito en:

- Cuidado de los animales de experimentación (cuidados que rodean al animal influyen en forma directa sobre el resultado de los experimentos).
- Bienestar de los animales (el estado de bienestar de los animales está íntimamente ligado a su capacidad de respuesta).

b) Se controlaron las condiciones de alojamiento:

- Cantidad de animales por jaula.
- Condiciones ambientales controladas (temperatura).

c) Se realizaron buenas prácticas de sujeción, inyección, analgesia, anestesia y eutanasia (pues el animal de laboratorio es un ser vivo y, por tanto, sensible a cualquier procedimiento capaz de causar dolor en el hombre).

## **IX. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio de tipo Experimental: donde se evaluó *In vivo* el efecto del extracto de alcaloides de Evanta sobre la actividad de los neutrófilos en modelo murino.

Se consideraron cuatro grupos:

- ◆ Grupo N° 1: Ratones hembras de la cepa Balb/c sin tratamiento (Grupo Control)
- ◆ Grupo N° 2: Ratones hembras de la cepa Balb/c tratados con Evanta a una dosis de 0,125 mg/mL
- ◆ Grupo N° 3: Ratones hembras de la cepa Balb/c tratados con Evanta a una dosis de 0,250 mg/mL
- ◆ Grupo N°4: Ratones hembras de la cepa Balb/c tratados con Glucantime a una dosis de 0,4 mg/día

El estudio se realizó en tres etapas y por triplicado:

- ◆ En la primera etapa se realizó el tratamiento de los ratones a las diferentes dosis por el lapso de un mes (30 días).
- ◆ En la segunda etapa se realizó la eutanasia y el cultivo celular de los neutrófilos de los diferentes grupos.
- ◆ En la tercera etapa se evaluó la actividad de los neutrófilos mediante la producción de óxido nítrico, fagocitosis e interleuquinas.

## **X. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. MATERIALES**

- Tubos Falcon estériles de 15 mL (Becton Dickinson)
- Pipetas pasteur de vidrio
- Filtros millipore 22 um (MILLIPORE)
- Pipetas de plástico estériles de 5 y 10 mL (Greiner Bio-One)
- Cánulas de administración por vía oral
- Jeringas de insulina de 1 mL
- Jeringas de 10 mL
- Propipeta
- Placas de cultivo de 96 pozos estériles (Becton Dickinson)

- Placas de ELISA de 96 pozos (Becton Dickinson)
- Estuche de disección

## 2. REACTIVOS

- Solución PBS celular 0,15 M, pH 7,4
- Extracto total de alcaloides de Evanta obtenido por extracción con Diclorometano provisto por el IIFB
- Glucantime (1,5g/5mL)
- LPS (lipopolisacárido)
- Tioglicolato al 3%
- Medio de cultivo RPMI con rojo fenol (Gibco)
- Suplementos para medio RPMI: (Hepes, Bicarbonato de sodio, Suero fetal bobino)
- Azul Tripán 0.2% (Sigma - Aldrich)
- Reactivo de Greiss
- Nitroazul de tetrazolio (Sigma)
- Kit ELISA para la determinación de IL-1alfa (R&D Systems)
- Kit ELISA para la determinación de IL-1beta (R&D Systems)
- Kit ELISA para la determinación de IL-8 (Invitrogen)

## 3. EQUIPOS

- Campana de flujo laminar (Nuaire Class II).
- Estufa de Incubación a 25° C (L W scientific, Inc.)
- Estufa de incubación a 37° C (Fisher scientific Isoterm)
- Estufa de incubación a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> (Nuaire Class).
- Microscopio Óptico (Olympus)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Centrifuga refrigerante
- Lector de ELISA (Awareness Technology Inc)

## 4. PROCEDIMIENTOS

### 4.1 ADMINISTRACIÓN DE EVANTA Y GLUCANTIME

El extracto de Evanta fue proporcionado por el Dr. Alberto Giménez del I.I.F.B.

Se prepararon las concentraciones de Evanta a partir de una concentración inicial de Evanta de 50 mg/mL.

Cada ampolla de Glucantime de 5 mL tiene 1,5 gramos de N glutamine, equivalente a 405 mg de antimonio pentavalente (30 mg/Kg/día).

Se estudiaron a 4 grupos, cada grupo estuvo conformado por tres ratones hembras de la cepa Balb/c.

- ❖ Al grupo N° 1 (grupo control) se les administró 100 uL de PBS celular por vía oral, cada día a los ratones por el lapso de 1 mes.
- ❖ Al grupo N° 2 se les administró 100 uL de Evanta a una dosis de 0,125 mg/mL por vía oral, cada día a los ratones por el lapso de 1 mes.
- ❖ Al grupo N° 3 se les administró 100 uL de Evanta a una dosis de 0,250 mg/mL por vía oral, cada día a los ratones por el lapso de 1 mes.
- ❖ Al grupo N° 4 se les administró 100 uL de Glucantime (0,4 mg/día) por vía intraperitoneal a los ratones por el lapso de 1 mes.

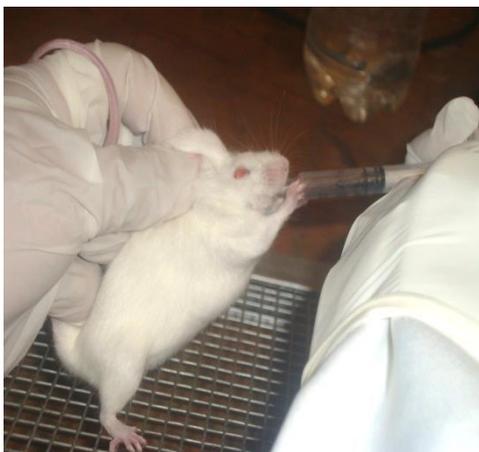


Fig. 19 Administración de Evanta por vía oral a ratones de la cepa Balb/c de los grupos de estudio.



Fig. 20 Administración de Glucantime por vía intraperitoneal a ratones de la cepa Balb/c del grupo de estudio.

Fuente: Bioterio Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas UMSA

## 4.2 AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS PERITONEALES

Una vez terminado el tratamiento de un mes; se inyectó por vía intraperitoneal 1mL de Tioglicolato al 3% a todos los ratones por la mañana y después de 4 horas se los sacrificó con Halotano y posterior dislocación.

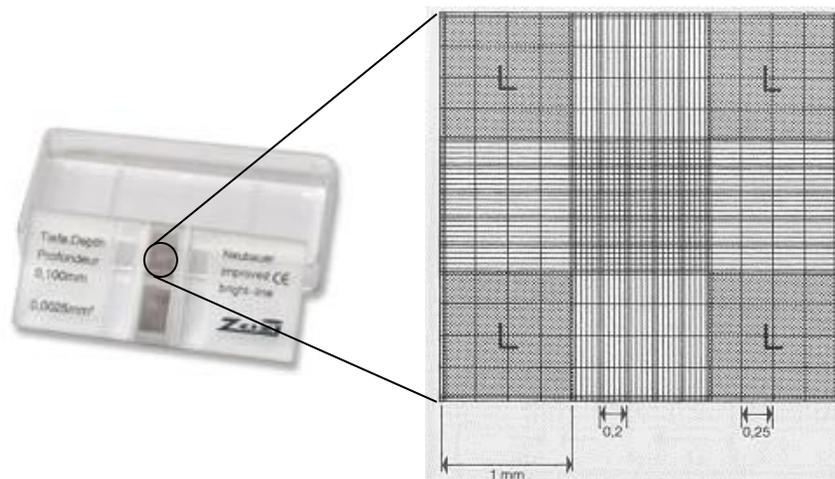
Se recuperaron las células peritoneales con un lavado de la cavidad con PBS celular y se centrifugaron a 1060 rpm por 10 minutos en una centrifuga refrigerante(4° C).

Se realizaron dos lavados de las células con PBS celular KRG (ver Anexo N°1) centrifugando a 1060 rpm por el lapso de 10 minutos en una centrifuga refrigerante(4° C).

## 4.3 VIABILIDAD Y AJUSTE CELULAR

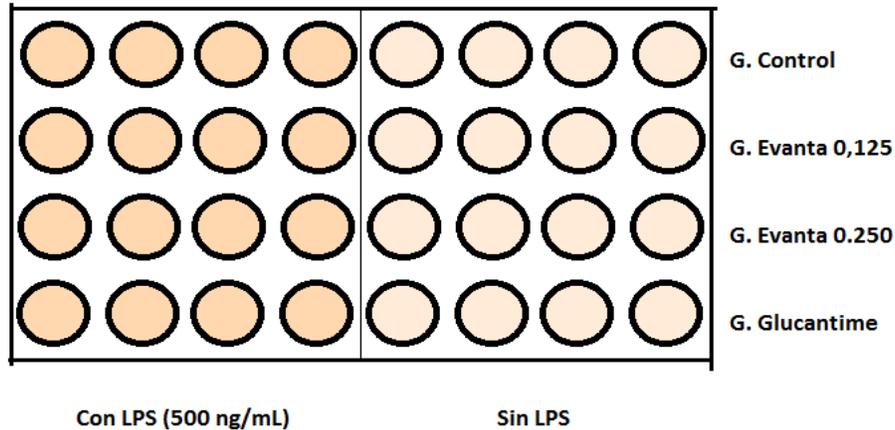
Para medir la viabilidad celular se utilizó azul tripán al 0.2% (ver Anexo N°2) realizando una dilución de las células 1:10, e inmediatamente se observó al microscopio, para realizar el recuento. La viabilidad fue mayor al 95%. Se realizó el ajuste celular a una concentración de  $1,3 \times 10^6$  cel/mL en medio RPMI (ver Anexo N°3).

El colorante Azul Tripán permite diferenciar las células vivas de las muertas. Las células vivas no absorben el azul tripán debido a que su membrana celular permanece intacta; sin embargo, el colorante atraviesa la membrana de las células muertas por lo que al microscopio se muestran de un color azul.



#### 4.4 CULTIVO CELULAR

Una vez ajustadas las células, se realizó el sembrado de las mismas en las placas de cultivo de 96 pozos, donde se siguió el siguiente protocolo.



Se añadió LPS (lipopolisacárido) a una concentración de 500 ng/mL, a las células ajustadas correspondientes, para luego sembrarlas en los pozos correspondientes con LPS. Se incubaron las células por 12 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 5 % humedad. Pasada las 12 horas se centrifugaron las placas a 1500 rpm por 5 minutos y se recuperaron los sobrenadantes en eppendorf bien identificados y luego se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

#### 4.5 PUREZA DE LAS CELULAS

Una vez ajustadas las células a  $1,3 \times 10^6$  cel/mL, se fijaron a los portaobjetos correspondientes bien identificados y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, luego se tiñeron con Giemsa (ver Anexo N°4).

Posteriormente se procedió al conteo de las células, un total de 100 células de cada una de las placas y fue por triplicado.

#### **4.6 FAGOCITOSIS A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DEL NAT**

La prueba del Nitro azul de tetrazolio (NAT), permite evaluar si las células son capaces de generar el estallido respiratorio necesarias para matar a los microorganismos fagocitados, las células que son capaces de reducir el NAT se observan de un color azul y utilizando un colorante de contraste (safranina), el resto de las células que no fueron capaces de producir las especies reactivas de oxígeno, se observan de un color naranja. El test hace un recuento del porcentaje de células fagocíticas coloreadas sobre el número total de células, a mayor número de células coloreadas mejor es la funcionalidad microbicida. (ver Anexo N°5)

Con las células ajustadas a  $1,3 \times 10^6$  cel/mL se colocaron a los portaobjetos en cámara húmeda a 37°C por el lapso de 30 minutos.

Se lavaron las placas con solución fisiológica y luego se añadió el reactivo Nitro azul de tetrazolio en cámara húmeda a 37°C por el lapso de 30 minutos.

Se lavaron las placas con solución fisiológica y se tiñeron con el colorante de contraste Safranina al 10% por 20 minutos. Las placas se lavaron y dejaron secar bien identificadas.

Luego se procedió al conteo de las células en el microscopio con el objetivo de inmersión, un total de 200 células por placa y por triplicado.

#### **4.7 PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO CON EL REACTIVO DE GREISS**

Como primer paso se realizó una curva del Nitrito de Sodio a partir de una concentración 1,07 mM hasta 100 mM.

La producción de óxido nítrico se determinó en los sobrenadantes de los cultivos de los diferentes grupos (grupo control, Evanta 0,125 mg/mL, Evanta 0,250 mg/mL y glucantime); se tomaron 25 uL del cultivo con 25 uL del reactivo de Greiss (ver Anexo N°6). Se incubaron 15 minutos en oscuridad y se leyeron las placas en el lector de Elisa 450 nm a 630 nm en el programa guardado.

#### **4.8 CUANTIFICACIÓN DE LA IL-1 $\alpha$ E IL-1 $\beta$ POR ELISA**

La cuantificación de la producción de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se realizó por la técnica de ELISA, utilizando un Kit comercial Elisa Sandwich R&D Systems. Las microplacas ya estaban recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de ratón y se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver Anexo N°7)

#### **4.9 CUANTIFICACIÓN DE LA IL-8 POR ELISA**

La cuantificación de la producción de IL-8 se realizó por la técnica de ELISA, utilizando un Kit Invitrogen. Primeramente se sensibilizó las placas con el Anticuerpo de Captura diluido en Coating Buffer y se incubo por 18 horas a 4°C y al día siguiente se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver Anexo N°8)

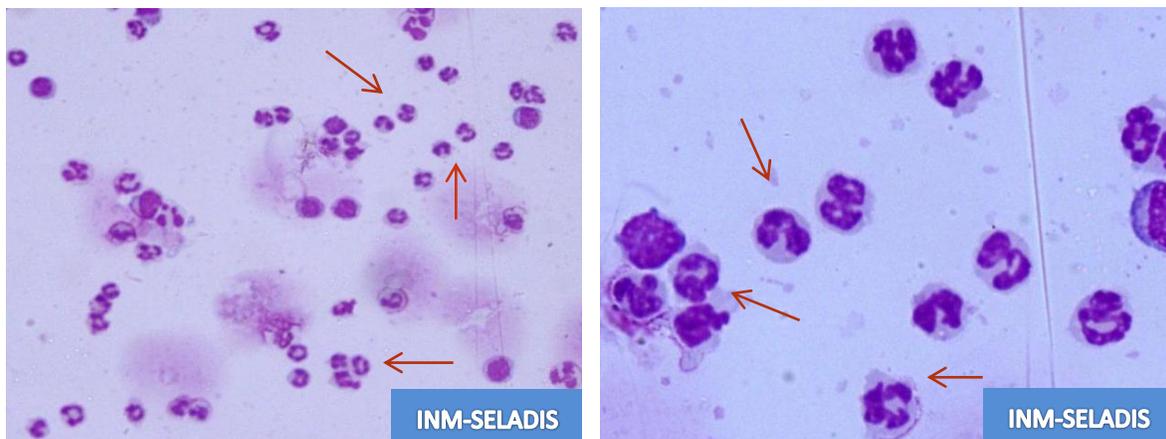
### **5. ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados fueron analizados con el Paquete estadístico MINITAB 15. Se determinaron medidas de tendencia central (promedio y desviación estándar), y las comparaciones de los grupos se realizó mediante ANOVA.

## XI. RESULTADOS

La población en estudio, estuvo constituida por 36 ratones hembras de la cepa Balb/c distribuidas en 4 grupos, cada grupo comprendida por 3 ratones, cabe mencionar que el estudio se realizó por triplicado.

El análisis de la pureza de neutrófilos peritoneales aislados en los diferentes grupos de estudio, teñidos con tinción Giemsa y observados al microscopio nos dio una pureza promedio del 77 %.

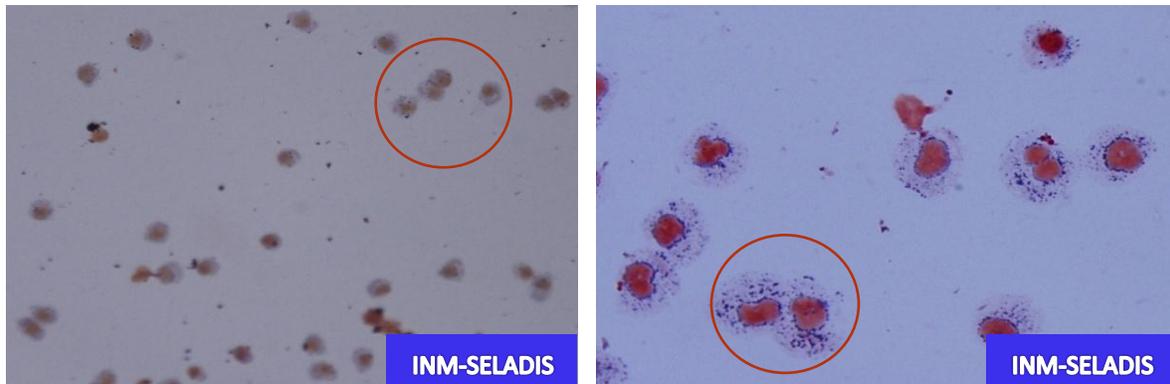


**Fig. 21 Neutrófilos peritoneales, observación al microscopio con tinción-giemsa 40x y 100x.** Los Neutrófilos obtenidos de cada grupo de estudio se ajustaron a una concentración de  $1,3 \times 10^6$  cel/mL y se tiñeron con tinción-giemsa.

La concentración de neutrófilos que se utilizó en los diferentes grupos de estudio fue de  $1,3 \times 10^6$  cel/mL. Una vez cultivadas y obteniéndose los sobrenadantes, se procedió a la evaluación del efecto del extracto de alcaloides de Evanta sobre la actividad de los neutrófilos, mostradas en las siguientes determinaciones:

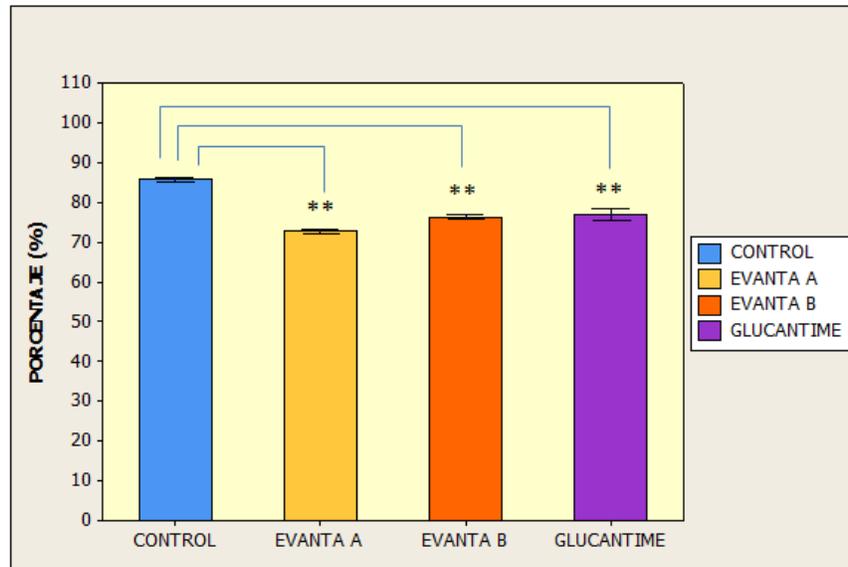
## 1. EVALUACIÓN DE FAGOCITOSIS A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DEL NAT EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE

Para determinar el efecto del EAE sobre la actividad de los neutrófilos en relación al estallido respiratorio, los diferentes grupos de estudio fueron tratados *In vivo* con Evanta y Glucantime.



**Fig. 22 Células Fagocíticas, observación al microscopio con objetivo 40x y 100x.** Los Neutrófilos obtenidos de cada grupo de estudio se ajustaron a una concentración de  $1,3 \times 10^6$  cel/mL y se realizó el examen con el Nitro azul de Tetrazolio.

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Fig. 23 donde podemos observar la fagocitosis a través de la reducción del NAT en los diferentes grupos de estudio, comparando estos grupos: el Grupo control con una media y DS de  $85,6 \pm 1,155$ ; Evanta A (0,125 mg/mL) con una media y DS de  $72,6 \pm 0,577$ ; Evanta B (0,250 mg/mL) con una media y DS de  $76,3 \pm 0,577$  y glucantime con una media y DS de  $77,0 \pm 2,646$ ; encontramos una  $p < 0,05$  % ( $p = 0.000$ ) (con un nivel de confianza del 95%), la cual es estadísticamente significativa. Se observa una disminución de la fagocitosis en los grupos tratados con Evanta y Glucantime en relación al grupo control.



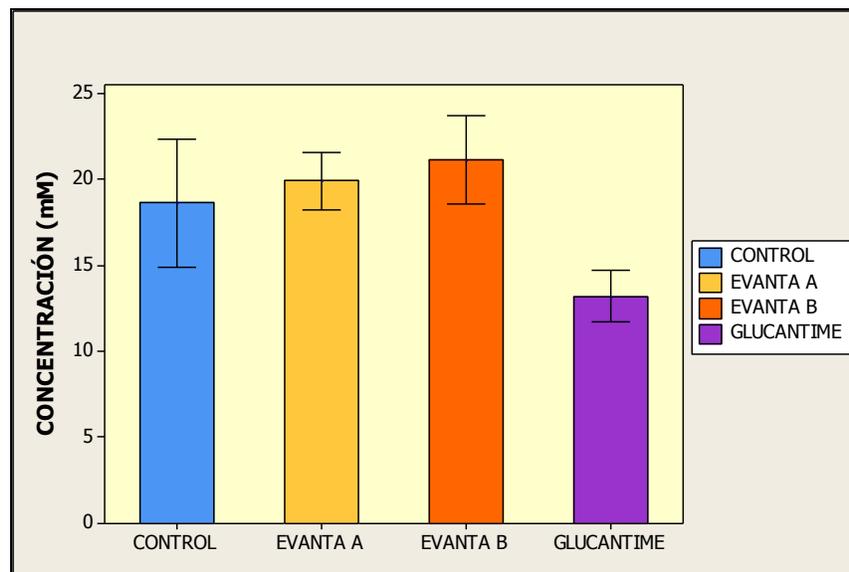
**Fig. 23 Efecto del EAE sobre la fagocitosis en Neutrófilos murinos.** Se contaron las células que redujeron el Nitro azul de Tetrazolio, un total de 200 células por placa y por triplicado expresados en porcentaje. Los resultados están representados en promedio  $\pm$  DS y los grupos tratados con la Evanta y Glucantime se compararon con el grupo control \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta A (0,125 mg/mL)** es estadísticamente diferente del control ( $p = 0,003$ ), estos resultados muestran una disminución de la fagocitosis (reducción del NAT) respecto al control.
- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta B (0,250 mg/mL)** también es estadísticamente significativa ( $p = 0,006$ ) dichos resultados muestran una disminución de la fagocitosis (reducción del NAT), respecto al control.
- ✓ Los resultados del **Grupo control y tratado con Glucantime** muestran que existe una diferencia significativa ( $p = 0,035$ ) comparado con el control. Este grupo fue incluido en el estudio con el objeto de evaluar el efecto del Glucantime sobre la fagocitosis, siendo el tratamiento convencional para la leishmaniasis.

## 2. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Fig. 24 donde se puede observar que la producción de óxido nítrico es ligeramente mayor en los grupos tratados con Evanta en relación al grupo control. Resultados que mostrarían que la Evanta no está afectando a la producción del óxido nítrico, principal mecanismo para la eliminación del parásito.

Comparando estos grupos: el Grupo control con una media y DS de  $18,6 \pm 6,500$ ; Evanta A (0,125 mg/mL) con una media y DS de  $19,9 \pm 2,900$ ; Evanta B (0,250 mg/mL) con una media y DS de  $21,1 \pm 4,400$  y glucantime con una media y DS de  $13,2 \pm 2,600$ ; encontramos una  $p > 0,05$  % ( $p = 0,208$ ) con un nivel de confianza del 95%, que no muestra una diferencia estadísticamente significativa, indicando que los grupos son similares.



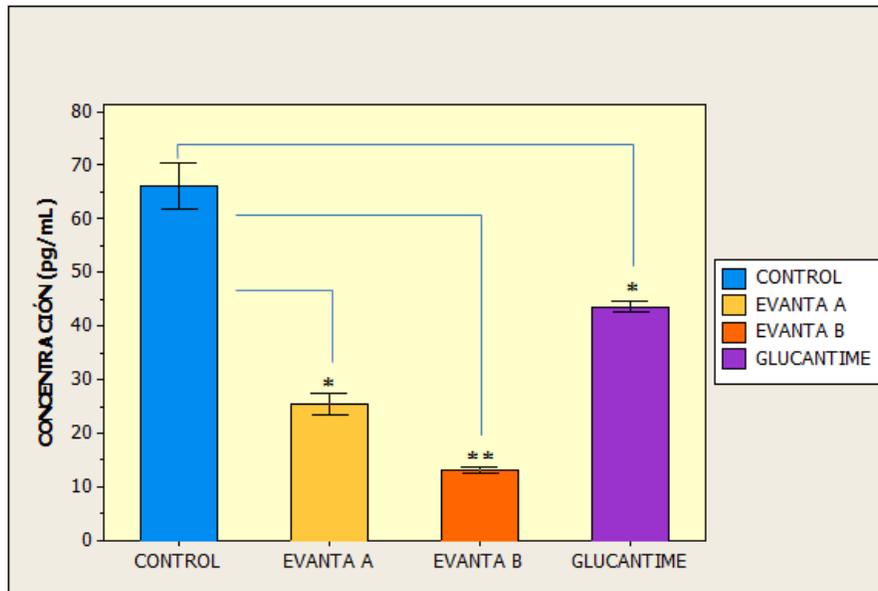
**Fig. 24 Efecto del EAE sobre la producción del óxido nítrico en Neutrófilos murinos.** Se cultivaron los Neutrófilos de los grupos tratados con Evanta, Glucantime y Control y en los sobrenadantes se cuantificó la producción del óxido nítrico con el reactivo de Greiss. Los resultados del ensayo están representados en promedio  $\pm$  DS, no se observan diferencias estadísticas significativas.

- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta A 0,125 mg/mL** no fue estadísticamente significativa ( $p= 0,782$ ), indicando que no hubo un efecto sobre la producción del óxido nítrico.
- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta B 0,250 mg/mL** no presenta una significancia estadística ( $p=0,620$ ), mostrando que no hay un efecto sobre la producción del óxido nítrico a esta dosis.
- ✓ Los resultados del **Grupo control y tratado con Glucantime** muestran que no existe una diferencia significativa ( $p = 0,313$ ) comparado con el control.

### **3. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\alpha$ EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE**

Los resultados de la producción de la interleuquina 1 alfa se muestran en la Fig. 25 donde podemos observar una menor producción en los grupos tratados con Evanta y glucantime en relación con el grupo control.

Comparando estos grupos: el Grupo control con una media y DS de  $66,2 \pm 7,564$ ; Evanta A (0,125 mg/mL) con una media y DS de  $25,6 \pm 3,453$ ; Evanta B (0,250 mg/mL) con una media y DS de  $13,2 \pm 1,217$  y glucantime con una media y DS de  $43,6 \pm 1,677$ ; encontramos una  $p < 0,05$  % ( $p= 0.000$ ) con un nivel de confianza del 95%, la cual indica una diferencia estadísticamente significativa, mostrando que los grupos son diferentes uno del otro.



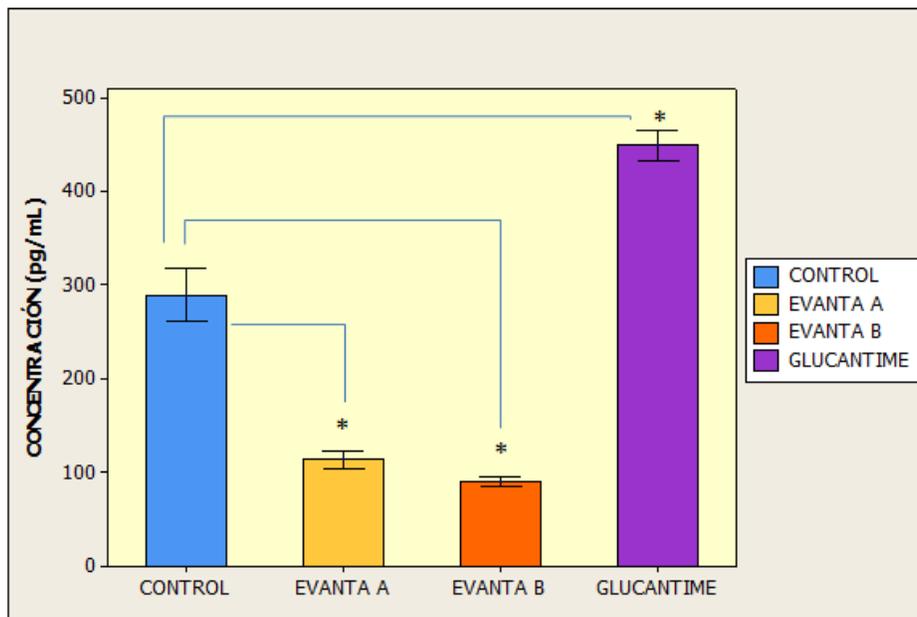
**Fig. 25 Efecto del EAE sobre la producción de IL- 1 $\alpha$  en Neutrófilos murinos.** Se cultivaron los Neutrófilos de los grupos tratados con Evanta, Glucantime y Control y en los sobrenadantes se cuantificó la producción de IL- 1 $\alpha$  por ELISA. Los resultados del ensayo están representados en promedio  $\pm$  DS. Los grupos tratados con Evanta y Glucantime se compararon con el grupo control \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta A 0,125 mg/mL** es estadísticamente diferente del control ( $p = 0,014$ ), estos resultados muestran una disminución dosis-dependiente en relación al grupo control.
- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta B 0,250 mg/mL** también es estadísticamente significativa ( $p = 0,007$ ), dichos resultados muestran una disminución dosis-dependiente.
- ✓ Los resultados del **Grupo control y el tratado con Glucantime** muestran que existe una diferencia significativa ( $p = 0,037$ ), mostrando una disminución en la producción de esta citoquina.

#### 4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE

Los resultados de la producción de la interleuquina 1 beta se muestran en la Fig. 26 donde podemos observar una menor producción por los grupos tratados con Evanta en relación al control, sin embargo el grupo tratado con glucantime presenta una producción mayor en relación al grupo control.

Comparando estos grupos: el Grupo control con una media y DS de  $289,1 \pm 48,59$ ; Evanta A (0,125 mg/mL) con una media y DS de  $114,0 \pm 16,94$ ; Evanta B (0,250 mg/mL) con una media y DS de  $89,9 \pm 8,90$  y glucantime con una media y DS de  $448,6 \pm 28,10$ ; encontramos una  $p < 0,05$  % ( $p = 0.000$ ) con un nivel de confianza del 95%, la cual indica una diferencia estadísticamente significativa, mostrando que los grupos son diferentes uno del otro.



**Fig. 26 Efecto del EAE sobre la producción de IL- 1 $\beta$  en Neutrófilos murinos.** Se cultivaron los Neutrófilos de los grupos tratados con Evanta, Glucantime y Control y en los sobrenadantes se cuantifico la producción de IL- 1 $\beta$  por ELISA. Los resultados del ensayo están representados en promedio  $\pm$  DS. Los grupos tratados con Evanta y Glucantime se compararon con el grupo control \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

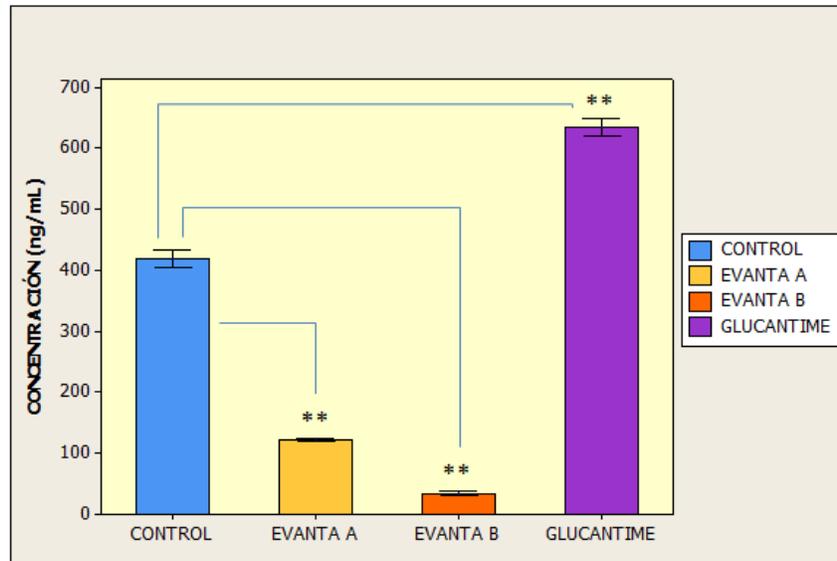
- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta A 0,125 mg/mL** es estadísticamente significativo ( $p = 0,028$ ), estos resultados muestran una disminución en la producción de esta citoquina (dosis-dependiente).

- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta B 0,250 mg/mL** también es estadísticamente significativa ( $p=0,020$ ) dichos resultados muestran una producción menor de esta interleuquina (dosis-dependiente) en relación al grupo control
- ✓ Los resultados del **Grupo control y tratado con Glucantime** muestran que existe una diferencia significativa ( $p = 0,016$ ) comparado con el control. Este grupo presentó una mayor producción de interleuquina 1 beta en relación al grupo control.

## **5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-8 EN NEUTRÓFILOS TRATADOS CON EL EAE**

Los resultados de la producción de la interleuquina 8 se muestran en la Fig. 27 donde podemos observar una menor producción de la interleuquina por los grupos tratados con Evanta en relación al control, sin embargo el grupo tratado con glucantime presenta una producción mayor en relación al grupo control.

Comparando estos grupos: el Grupo control con una media y DS de  $418,6 \pm 24,65$ ; Evanta A (0,125 mg/mL) con una media y DS de  $122,3 \pm 4,50$ ; Evanta B (0,250 mg/mL) con una media y DS de  $34,4 \pm 5,39$  y Glucantime con una media y DS de  $633,8 \pm 23,46$ ; encontramos una  $p < 0,05$  % ( $p= 0.000$ ) con un nivel de confianza del 95%, la cual muestra una diferencia estadísticamente significativa, mostrando que los grupos son diferentes uno del otro.



**Fig. 27 Efecto del EAE sobre la producción de IL- 8 en Neutrófilos murinos.** Se cultivaron los Neutrófilos de los grupos tratados con Evanta, Glucantime y Control y en los sobrenadantes se cuantificó la producción de IL- 8 por ELISA. Los resultados del ensayo están representados en promedio  $\pm$  DS. Los grupos tratados con Evanta y Glucantime se compararon con el grupo control \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta A 0,125 mg/mL** es estadísticamente significativo ( $p = 0,002$ ), estos resultados muestran una producción menor de la interleuquina 8 por el grupo tratado con Evanta en comparación con el grupo control, (una disminución dosis-dependiente).
- ✓ El **Grupo control y el tratado con Evanta B 0,250 mg/mL** también es estadísticamente significativa ( $p = 0,001$ ) dichos resultados muestran una producción menor de esta interleuquina en relación al grupo control, (una disminución dosis-dependiente).
- ✓ Los resultados del **Grupo control y tratado con Glucantime** muestran que existe una diferencia significativa ( $p = 0,002$ ) comparado con el control. Este grupo presentó una mayor producción de interleuquina 8 en relación al grupo control.

## XII. DISCUSIÓN

El uso de las plantas medicinales a nivel mundial está cobrando gran interés como una alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades, puesto que tiene variadas propiedades y componentes como ser: alcaloides quinólicos, flavonoides, terpenos, saponinas, naphtoquinas, taxoides y glucósidos entre otros, que lo hacen muy beneficioso. Porque estos han comprobado ser activas a diferentes niveles. Es así que desde el año 1993 se han llevado a cabo diferentes estudios acerca de la actividad leishmanicida del extracto de alcaloides de Evanta, que han brindado resultados favorables, ya que a una concentración *In vitro* de 10µg/mL mata directamente al parásito. Sin embargo, esta actividad leishmanicida estaría combinada con efectos sobre la respuesta inmune que se desarrolla tras la infección de la persona con el parásito. <sup>(45)(46)</sup>

Se han desarrollado estudios acerca del extracto de alcaloides de Evanta y su influencia sobre macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Pacientes con leishmaniasis tratados con Evanta presentaron una reducción tanto en la proliferación celular como en la producción del IFN-γ, efectos que podrían contribuir al control de la reacción inflamatoria en comparación con el Glucantime. Se ha observado que mantiene la capacidad microbicida del macrófago, atenuando los mecanismos de evasión del parásito. <sup>(48)(49)(50)(51)(52)(53)</sup>

Sin embargo es importante conocer el efecto del extracto de alcaloides de Evanta sobre las células de la respuesta inmune innata, porque estos son las primeras células que entran en contacto con el parásito, ya que son rápidamente reclutadas al sitio de infección y dependiendo de cómo ellas respondan a la infección se direccionara a una respuesta Th1 o Th2, que ayudara a la eliminación del parásito o contribuiría a la gravedad de la enfermedad. <sup>(4)</sup>

En el presente estudio evaluamos el efecto del extracto de alcaloides de Evanta sobre la actividad de los neutrófilos en modelo murino.

Para iniciar el estudio se obtuvieron neutrófilos peritoneales cuya pureza fue del 77 % en comparación con otros estudios realizados del 88% <sup>(72)</sup>

En cuanto al test de fagocitosis ver Fig. 23, los grupos tratados con Evanta y glucantime presentaron valores menores respecto al control, estadísticamente significativa con una  $p < 0,05\%$ . Indicando una disminución en la reducción del Nitro Azul de Tetrazolio, prueba que evalúa una parte de la fagocitosis, relacionada con la capacidad de las células fagocíticas de producir las especies reactivas de oxígeno para eliminar al agente extraño. Si bien no existen estudios similares, se ha visto que una adecuada y controlada producción de las EROS, podrían evitar que las células fagocíticas liberen su contenido al medio extracelular dañando tejido, porque cuando se exceden los niveles de EROS, se produce daño molecular y conjuntamente con las especies reactivas del nitrógeno pueden constituirse en un mecanismo de daño y muerte celular.

Un estudio realizado con alcaloides y flavonoides <sup>(56)(60)(61)</sup> mostraron una disminución en la fagocitosis, como una medida de protección contra la inflamación crónica. Algunos antimoniales pentavalentes pueden aumentar la capacidad fagocítica del neutrófilo incrementando la producción de superóxidos. Sin embargo otros como el Clorhidrato de Berberina, promueven la eliminación del parásito induciendo la apoptosis de los neutrófilos infectados con *Leishmania* con la siguiente modulación de la MAP kinasa. <sup>(69)</sup>

La producción de óxido nítrico mostrada en la Fig. 24, expone que los grupos tratados con Evanta y glucantime no muestran una diferencia significativa respecto al grupo control. Se ha visto que la producción de óxido nítrico es el principal responsable de la destrucción de microorganismos intracelulares como la leishmaniasis. En nuestro estudio la Evanta no afectaría a la producción del óxido nítrico, manteniendo su mecanismo microbicida para la destrucción del parásito.

Según estudios, una disminución en la expresión de iNOS, la cual es necesaria para la producción del NO en las células, podría permitir la sobrevivencia del parásito en la célula y por lo tanto contribuiría a la progresión de la enfermedad. Varios estudios indican que las células infectadas por *Leishmania* inducen la liberación de óxido nítrico, ion superóxido y peróxido de hidrogeno de 3 a 5 veces más altas que las células no infectadas, observándose además, una menor carga parasitaria en

la lesión asociado a un incremento de estas moléculas especies reactivas de oxígeno. <sup>(69)(70)(71)</sup> Sin embargo, es uno de los mecanismos que bloquea el parásito para sobrevivir y seguir infectando a otras células.

El uso de los medicamentos tradicionales antimoniales incrementan la generación de EROS, sin embargo, algunos compuestos podrían ejercer su acción leishmanicida independiente de la activación o no del óxido nítrico. <sup>(69)(70)(71)</sup>

La producción de la interleuquina 1 $\alpha$  en la Fig. 25 fue menor en los grupos tratados con Evanta y Glucantime respecto al control con una  $p < 0,05\%$ . Se observó un efecto dosis-dependiente; es decir a una mayor dosis de Evanta B (0,250 mg/mL) mayor fue la inhibición de la producción de esta interleuquina, similar al estudio donde encontró una disminución del IFN- $\gamma$  dosis-dependiente. <sup>(49)</sup>

La determinación de citoquinas es importante en la dirección de la respuesta inmune ya sea para una respuesta Th1 o Th2. Esta interleuquina ejerce diferentes acciones dentro de ellas podemos mencionar: vasodilatación y permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación y tiene actividad quimiotáctica sobre los granulocitos. Según estudios la secreción de IL-1 $\alpha$  en células dendríticas de ratones Balb/c infectados con *L. major* fue menor que en los ratones de la cepa C57BL/6, y que la administración de IL-1 $\alpha$  disminuye el tamaño de la lesión, incrementando una respuesta Th1 previniendo la progresión de la enfermedad. <sup>(65)(66)(69)</sup>

La disminución de esta interleuquina por el efecto de la Evanta podría ser una forma de controlar la inflamación y la respuesta inmune frente al parásito.

Los resultados de la interleuquina 1- $\beta$  mostrados en la Fig. 26 revelan una menor producción de IL-1 $\beta$  en los grupos tratados con Evanta respecto al control, sin embargo en el grupo tratado con glucantime presentó una mayor producción de IL-1 $\beta$  respecto al control con una  $p < 0,05\%$  la cual es estadísticamente significativa. Aunque no existen estudios sobre la producción de esta interleuquina por los neutrófilos influenciadas por la Evanta. Esta interleuquina ha sido asociada con la severidad de la enfermedad, pues en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa y

localizada se han encontrado niveles elevados de IL-1 $\beta$ . Sin embargo otros estudios lo asocian con la regulación del transporte de *Leishmania*, del sitio de la infección hacia los nódulos linfáticos y que junto a la IL-6 son potentes citoquinas pro-inflamatorias involucradas en la producción de NO y activación de los macrófagos. En nuestro estudio se observó una disminución de IL-1 $\beta$  en animales tratados con Evanta, que podría ser una forma de controlar la inflamación. En el caso de los animales tratados con Glucantime la producción de IL-1 $\beta$  fue elevada, lo que según algunos estudios podría conducir a una respuesta inflamatoria crónica, destrucción de tejido <sup>(65)(66)(69)</sup> De igual forma se observó un efecto dosis-dependiente en los grupos tratados con Evanta, donde se muestra una menor inhibición en el grupo Evanta A (0,150 mg/mL) que Evanta B (0, 250 mg/mL), resultados similares a otros estudios. <sup>(49)</sup>

Otras de las citoquinas evaluadas fue la interleuquina 8 en la Fig. 27, los grupos tratados con Evanta presentaron valores menores en comparación con el grupo control, en cambio el grupo tratado con glucantime presentó valores superiores al control con una  $p < 0,05$  % estadísticamente significativa. Esta interleuquina promueve la quimiotaxis, controlando la infección temprana vía reclutamiento y activación de los neutrófilos y liberación de NO, es inducida por estímulos proinflamatorios, como el LPS bacteriano, IL-1, TNF e IFN- $\gamma$ . Se ha observado *in vivo* que la neutralización con anticuerpos de conejo dirigidos contra la IL-8, y las proteínas GRO y MIP-2, reduce significativamente la inflamación mediada por neutrófilos en varios modelos de inflamación aguda, por lo que la IL-8, además de otras quimioquinas, puede tener un papel importante en la patogénesis de la respuesta inflamatoria <sup>(67)(68)(69)</sup> La disminución dosis-dependiente de la IL-1 $\alpha$  por el efecto de la Evanta, podría controlar la respuesta inflamatoria aguda. <sup>(49)</sup>

Haciendo un panorama general de los resultados obtenidos, observamos que los valores fueron menores en los grupos tratados con Evanta respecto al control, tanto en el test de fagocitosis, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, mostrando que la Evanta disminuye la producción de las citoquinas, que podría contribuir al control de la inflamación aguda.

### **XIII. CONCLUSIONES**

- ✓ Determinamos que el EAE reduce la fagocitosis, no siendo dosis-dependiente.
- ✓ No se observó ningún efecto sobre la producción de óxido nítrico, es decir la actividad microbicida no fue afectada por el EAE.
- ✓ Se observó una disminución en la producción de las citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 fueron menores en los grupos tratados con EAE, observándose un efecto dosis-dependiente (a mayor dosis mayor inhibición de la producción de citoquinas).
- ✓ En general, los resultados muestran el efecto inmunomodulador de la Evanta apoyando a aquellos estudios en donde la actividad del EAE, no solo se debe a su acción directa sobre el parásito sino también a su acción sobre la respuesta inmune. La disminución de estas citoquinas podría contribuir a un mejor control de la inflamación aguda. Considerándola como una buena alternativa en el tratamiento de los pacientes infectados con leishmaniasis.

### **XIV. RECOMENDACIONES**

Los estudios realizados hasta el momento muestran un rol inmunomodulador de la Evanta sobre la respuesta inmune, principalmente en linfocitos, células dendríticas y macrófagos. Sin embargo sería importante ver el efecto del EAE sobre neutrófilos provenientes de ratones infectados con el Antígeno de *Leishmania* y tratados con el extracto de alcaloides de Evanta, y evaluar su capacidad microbicida y la producción de citoquinas, que brinden una mayor información, pues estas células son las primeras en ser reclutadas al sitio de infección.

## XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez Leonardo, Sáenz Eliana, Pancorbo Julia, Zegarra Del Carpo Robert, Garcés Norma, Regis Alberto. Leishmaniasis. *Dermatología Peruana* 2004; 14 (2): 82-98.
2. Mollinedo Sergio, Torrez Miguel; Holguín Edwin; Vargas Fernando. Leishmaniasis en Bolivia X. *Epidemiología de fin de siglo. Unidad de Parasitología INLASA; La Paz Bolivia* 2000.
3. *Weekly Epidemiological Record. World Health Organization. N° 44. November 2002. p. 77-365-372.*
4. Bonilla Escobar Diana Lucía. Respuesta inmune a la leishmaniasis: algo más que linfocitos T. *Piel.* 2005; 20 (8): 383-395.
5. Giménez Alberto, Ávila Juan Antonio, Ruiz Grace, Paz Magali, Udaeta Enrique, et al. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora*, Krause. *Revista Boliviana de Química* 2005; 22 (1): 94-107.
6. Calla Jacqueline, Troye Blomberg Marita, Fernández Carmen. El extracto de Alcaloides de *Galipea longiflora* (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro-inflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral e Interferon $\gamma$  *In vitro.* *Biofarbo* 2006; 14: 57-66.
7. Abbas, Lichtman, Pober. *Inmunidad Innata. Inmunología Celular y Molecular.* 2° ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1995.
8. Abumohor G Patricia. *Fisiología de la Respuesta Inmune. Sección de Inmunología, Hospital Clínico, Universidad de Chile. Reumatología* 2005; 21(2): 51-57.
9. Brandan Nora, Aquino José, Codutti Alexis. *Respuesta Inmunitaria. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina UNNE. 2007: 1-18.*  
<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/inmunitaria.pdf>
10. *Inmunología. Curso 2009-10. Tema 4. Inmunidad innata. Disponible en:*  
<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/documentostemas/TEMA%204.pdf>
11. Regueiro J, López C, González S, Martínez E. *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune.* 3° ed. Madrid: ;2008.

12. Griho.net [Internet]. Microscopia Virtual. Disponible en : <http://griho2.udl.es/carles/medicina/index.html>
13. Díaz Pedro, Ocampo Antonio, Fernández Javier. Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. *Medicina Oral* 2002; 7 (3): 206-215.
14. Peakman Mark, Vergani Diego. Inmunidad Innata: Mecanismos celulares. *Inmunología Básica y Clínica*. 2º ed. España: ELSEVIER; 2011.p. 23-33.
15. Del Olmo Laura. Leucocitos: Granulocitos (PMN) Neutrófilos (I), Eosinófilos (II) y Basófilos (III). Disponible en: <http://www.veoapuntes.com/MEDICINA/1/HISTOLOGIA/T5.%20Leucocitos.%20GRANULOCITOS.pdf>
16. Frías M, Castro L y Peña, J. Tráfico de células inmunocompetentes. p. 1-9. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/pdfcaps/tema-06.pdf>
17. Charles A. Janeway, JR. Fundamentos de la Inmunidad innata y adaptativa. El sistema de Complemento. 4º ed. Barcelona-España: MASSON; 2000. p. 339-355.
18. Warren Lee, Harrison Rene, Grinstein Sergio. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* 2003;5: 1299-1306.
19. Rojas Espinosa Oscar, Arce Paredes Patricia. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. *Bioquímica* 2004; 29 (2): 55-67.
20. Martinez Eddy. El género *Leishmania* y las Leishmaniasis. Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo (IINSAD) 2010. p 1-25.
21. Jawets, Melnick y Adelberg. Parasitología Leishmaniasis. *Microbiología Médica*. 23º ed. México: El Manual Moderno: 2005. p. 663-6670.
22. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, Elsevier 2004: 305–318.
23. Charmoy Mélanie, Auderset Floriane, Allenbach Cindy, Tacchini-Cottier Fabienne The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by *Leishmania* Parasites \*Immunology Research and Training Center, Department of Biochemistry, University of Lausanne 2010; 4(3):150-165.

24. Peniche Trujillo Alex Giovanny. Los neutrófilos en la evolución parasitológica y clínica de la leishmaniasis. *Teoría y praxis Investigativa* 2008; 3 (1): 37-47.
25. Mc Farlane Emma, Perez Cynthia, Allenbach Sindy, et al. Neutrophils Contribute to development of a protective Immune response during Onset of Infection whit Leishmania. *Immunology* 2007; 10: 150-135.
26. Erico Vinicius de Souza Carmo, Simone Katz, Clara Lucia Barbieri. Neutrophils Reduce the Parasite Burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis Infected Macrophages. *PLoS ONE* 2010; 5(11): 1-8.
27. Filardy Alessandra, Pires Dayana, Dos Reis George. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to Leishmania infection. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011; 68(11): 1863-1870.
28. Hidenori Hattori, Kulandayan Subramanian, Jiro Sakai, Yonghui Jia, Yitang Li, Timothy Porter, et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Cell Biology PNAS* 2010; 107(8): 3546-3551.
29. David A. Wink, Harry B. Hines, Robert Y. S. Cheng, Christopher H. Switzer, Wilmarie Flores-Santana, Michael P. Vitek, Lisa A. Ridnour, Carol A. Colton. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Jornel Leukocyte Biology* 2011; 89 (6): 873–891.
30. Hernández Ruiz Joselín, Becker Ingeborg. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la Leishmaniasis cutánea. *Salud Pública de México* 2006; 48(5): 430-439.
31. M. T. M. Roberts. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin* 2006; 76: 115–130.
32. De Oliveira Camila, Brodskyn Claudia. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. *Frontiers in Inmunology* 2012; 145 (3): 1-9.
33. Alexander James, Brombacher Frank. T helper 1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to Leishmania infection: is this paradigm still relevant?. *Frontiers in Inmunology* 2012; 80 (3): 1-13.

34. Aguirre de Avalos, Quintana R., Brandan N. Citoquinas. Universidad Nacional del Noreste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina U.N.N.E. 2002: 1-19. Disponible en: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/citoquinas.pdf>
35. Suárez A., Mozo L. , Gutiérrez Martín C. 09 Citocinas y quimiocinas. <http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/inmunologia/tema09/etexto09.htm>
36. Hernández Urzúa Miguel, Alvarado Navarro Anabell. Interleucinas e inmunidad innata. *Biomed* 2001; 12 (4): 272-280.
37. Vélez Susana, Camargo José, Correa Paula, Anaya Juan Manuel. Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Asociación Colombiana de Reumatología* 2004;11(1): 11-39.
38. Rodríguez Tafur Dávila Juan Manuel, Sanguineti Díaz Ana Cecilia, Núñez Vergara Guillermo. *Inmunodermatología Citoquinas y piel (parte I)*. *Dermatológica Peruana* 1995. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/vol6\\_n3/citoquinas.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/vol6_n3/citoquinas.htm)
39. Rojas Sara. Citocinas e Inflamación. Disponible en: <http://www.amimc.org.mx/revista/2005/25-2/citocinas.htm>
40. Oghumu Steve, Lezama-Dávila Claudio, Isaac-Márquez Angélica, Satoskar Abhay. Role of Chemokines in Regulation of Immunity against Leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2010; 126 (3): 389–396.
41. Mollinedo Pérez Sergio. Ministerio de Salud y Previsión Social, Unidad Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Laboratorio Nacional de Parasitología y Entomología. *Manual Práctico de Tratamiento de la leishmaniasis*. Publicación Técnica N° 10.p. 1-35. Disponible en: <http://www.galenored.com/trabajos/archivos/132.pdf>
42. Monzote Lianet. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *The Open Antimicrobial Agents Journal* 2009; 1: 9-19.
43. Llanos Fabiola, Espinoza Boris, Salamanca Efraín, Churqui Rogelio, Flores Ninoska, Giménez Alberto. Extracción acuosa de corteza de *Galipea longiflora* y su actividad leishmanicida. *BIOFARBO* 2009; 17 (2): 32-38.

44. Paz Magalí, Vasquez Felipe, Chuqui Rogelio, Paredes Crispín, Sauvain Michel, Gimenez Alberto. Establecimiento de Cultivos In Vitro de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana. *Latin American Journal of Pharmacy* 2007; 26(1): 15-19.
45. Fournet Alain, Barrios Alcira, Muñoz Victoria, Hocquemiller Reynald, Cave Andre, Bruneton Jean. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37(4): 859-863.
46. Fournet Alain, Ferreira Maria Elena, Rojas de Arias Antonieta, Torres de Ortiz Susana, Fuentes Sandra, Nakayama Hector, et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40(11): 2447-2451.
47. Salamanca Capusiri Efrain. Actividad antiparasitaria múltiple de Alcaloides totales de Corteza de *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta). [Tesis de Maestría]. La Paz: I.I.F.B., Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.; 2008
48. Montes Cordero F. Evaluación de la Respuesta proliferativa y de producción de Citoquinas de Linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea. [Tesis de Licenciatura]. La Paz: Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.; 2011.
49. Ruiz Rosales K. Evaluación de la Reactivación In Vitro de Linfocitos provenientes de ratones inmunizados con el antígeno de leishmania y tratados con el Extracto total de Alcaloides de Evanta. [Tesis de Especialidad]. La Paz: Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.; 2012.
50. Quispe Soto T. Efecto del Extracto de alcaloides totales de Evanta sobre macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* In-Vitro. [Tesis de Especialidad]. La Paz: Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.; 2012.

51. Calla-Magarinos Jacqueline, Gimenez A., Troye-Blomberg M., Fernandez C. An Alkaloid Extract of Evanta, Traditionally Used as Anti-leishmania Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- $\gamma$  Production in Polyclonally Activated Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 2009; 69(3): 251-258.
52. Calla-Magariños Jacqueline, Quispe Teddy, Giménez A., Freysdottir J., Troye-Blomberg M., Fernandez C. Quinolinic Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause Suppress Production of Proinflammatory Cytokines *in vitro* and Control Inflammation *In vivo* upon Leishmania Infection in Mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 2013; 77: 30-38.
53. Calla-Magariños Jacqueline, Fernández Carmen, Troye-Blomberg Marita, Freysdottir Jona. Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause modify the maturation of human dendritic cells and their ability to stimulate allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunopharmacology* 2013; 16(1): 79-84.
54. Sánchez Suárez Jeysson, Albarracín Diego, Rojas Maritza, Rincón Javier, Robledo Sara, Muñoz Diana, et al. Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumense* y *Piper holtonii*. *Colombiana Ciencia Química Farmacéutica* 2010; 39(1): 21-29.
55. Sánchez Suárez Jeysson. Efecto leishmanicida e inmunomodulador *in vitro* de extractos y compuestos de plantas colombianas de las familias Lauraceae y Rutaceae. [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina.; 2011.
56. Saha Piu, Bhattacharjee Surajit, Sarkar Avijit, Manna Alak, Majumder Subrata, Chatterjee Mitali. Berberine Chloride Mediates Its Anti-Leishmanial Activity via Differential Regulation of the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway in Macrophages. *PLoS One* 2011;6 (4): 18467.
57. Moreno Rodríguez Amanda, Robles Camargo Jorge, Bello García Felio. Actividad *In vitro* de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008; 18(3): 350-355.

58. Inostroza Luis, Castro Américo, Hernández Eloisa, Casanova Hugo. Evaluación de la actividad leishmanicida y toxicidad aguda del Extracto hidroalcohólico de los tallos de *Croton alnifolius*. *Ciencia e Investigación* 2011; 14(2): 15-21.
59. Ríos Yesmit, Otero Astrid, Muñoz Diana, Echeverry Mónica, Robledo Sara, Yepes Maira. Actividad citotóxica y leishmanicida *In vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2008; 37(2): 200-211.
60. Polonio Tilman, Efferth Thomas. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2008; 22: 277-286.
61. Nijveldt Robert, van Nood Els, EC van Hoorn Danny, Boelens Petra, van Norren Klaske, AM van Leeuwen Paul. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition* 2001; 74: 418–25.
62. Carvalho Lucas, Passos Sara, Schriefer Albert, Carvalho Edgar. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* 2012; 3(301): 1-9.
63. Ribeiro Gomes Flavia, Sacks David. The influence of early neutrophil *Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2(59): 1-8.
64. Laskay Tamas, Zandbergen Ger van, Solbach Werner. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection promoting factor. *Elsevier Immunobiology* 2008; 213: 183-191.
65. Esther von Stebut, Jan M. Ehrchen, Yasmine Belkaid, Susanna Lopez Kostka, Katharina Mölle, Jürgen Knop, Cord Sunderkötter, and Mark C. Udey. Interleukin 1 $\alpha$  Promotes Th 1 Differentiation and Inhibits Disease Progression in *Leishmania major*–susceptible Balb/c Mice. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 198(2): 191-199.

66. Fernández Figueroa Edith, Rangel Escareño Claudia, Espinosa Mateos Valeria, Carrillo-Sánchez Karol, Salaiza Suazo Norma, Carrada Figueroa Georgina, March Mifsut Santiago, Ingeborg Becker. Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL-1b. PLoS 2012; 6 (5): 1-9.
67. Van Zandbergen G., Hermann N., Laufs H., Solbach W., Laskay T. *Leishmania* Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. Infection and Immunity 2002; 70 (8): 4177-4184.
68. Rajesh Kumar, Ram A. Bumb and, Poonam Salotra. Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors. Immunology 2010; 130: 193-201.
69. Piu Saha, Debanjan Mukhopadhyay, Mitali Chatterjee. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. International Immunopharmacology 2011; 1-12.
70. Horta María, Pinheiro Bárbara, Roma Eric, Motta Fatima, Pereira Juan, Souza Luciana, et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. J. Parasitology 2012; 11pag doi:10.1155/2012/203818.
71. Almeida T. F., Palma L. C., Mendez L. C., Noronha-Dutra A. A., Veras P. S. T. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. Parasite Immunology 2012; 34: 492-498
72. Ito Takuya, Collins Vincent, Thorén Fredrik, Dahlgren, Karlsson Anna. Changes in Activation States of Murine Polymorphonuclear Leukocytes (PMN) during Inflammation: a Comparison of Bone Marrow and Peritoneal Exudate PMN. Clinical and Vaccine Immunology 2006; 13(5): 575-583

## **XVI. ANEXOS**

### **ANEXO N° 1**

#### **Buffer Phosphate Krebs-Ringer (KRG):**

Para preparar 1000 mL de KRG, se debe pesar:

- 2,437 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 8,09 g de  $\text{NaHPO}_4$ ,
- 4,38 g de  $\text{NaCl}$
- 0,147 g de  $\text{Ca Cl}_2$  (1 mM)
- 0,305 g de  $\text{Mg Cl}_2$  (1,5 mM)
- 1,8 g de Glucosa (10 mM)

Se disuelve cada uno por separado en agua inti y luego se mezcla en un vaso de precipitado, se ajusta el pH a 7,3 con  $\text{NaOH}$  concentrado, luego se enrasa en un matraz aforado de 1000 mL con agua inti.

### **ANEXO N° 2**

#### **Recuento y Viabilidad celular a través del ensayo de exclusión de colorante azul tripan.**

- 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
- En un tubo, colocar 10uL del colorante diluido y añadir 90uL de células, mezclar, 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 células peritoneales vivos dividido entre el número total de células peritoneales y luego multiplicar por 100.

### **ANEXO N° 3**

#### **Medio RPMI**

##### **RPMI suplementado.**

Para 500 mL, pesar:

- 8,175 g de RPMI
- 1 g de Bicarbonato de Sodio

Se los disuelve en agua destilada, obteniendo un color rosado salmón, se filtra en la campana de flujo laminar, se toma 450 mL de lo filtrado para suplementar con 5 mL de glutamina, 2,5 mL de penicilina/estreptomicina (Pest) y 50 mL de Suero Fetal Bobino (SFB). Se alícuota en tubos falcón de 50 mL estériles, y se pone a congelar.

### **ANEXO N° 4**

#### **Tinción Wright-Giemsa:**

- Colocar las placas de las células, en la gradilla de tinción adecuada
- Cubrir el portaobjetos con 1-2 mL de tinción de Wright-Giemsa
- Tras 3 minutos, añadir un volumen igual de agua desionizada o tampón fosfato pH 6,8-7,2 y mezclar bien soplando con cuidado sobre el portaobjetos
- Tras 1–2 minutos, aclarar bien con agua desionizada y secar al aire

### **ANEXO N° 5**

#### **Nitroazul de Tetrazolio:**

En ciertas enfermedades existe un defecto en la NADPH oxidasa, por el cual las células fagocíticas son incapaces de producir especies reactivas de oxígeno ( $H_2O_2$ ,  $HO_2$ ) o los radicales ( $HO^{\cdot}$ ) necesarios para matar a los microorganismos fagocitados, como resultado los microorganismos continúan vivos dentro del fagocito, lo que causa entre otras cosas infecciones recurrentes y la formación de granulomas.

Las células que son capaces de producir el estallido respiratorio son capaces también de reducir el Nitro azul de Tetrazolio (NAT), principio en el cual se basa el test. Las células se exponen a una solución que contiene NAT y un estimulante de

la fagocitosis. Luego se utiliza la safranina que va a teñir a aquellas células que no redujeron el NBT y luego se observan al microscopio. Las células que produjeron el estallido respiratorio muestran una coloración azulada (las vesículas fagocíticas donde se produjo la reducción del NBT). El test hace un recuento del porcentaje de células fagocíticas coloreadas sobre el número total de células.

Nitro azul de Tetrazolio

Safranina al 10%

## **ANEXO N° 6**

**Reactivo de Greiss**, está compuesto de:

- 0,2% de diclorhidrato de naftiléndiamina
- 2% de sulfanilamida en ácido fosfórico al 5%

Cuando se agrega el ácido sulfanílico, los nitritos forman una sal de diazonio. Cuando se agrega la  $\alpha$ -naftilamina, se desarrolla un color rosado.

## **ANEXO N° 7**

**Interleuquina 1 alfa y beta**, Elisa Sandwich R&D Systems.

El Kit contiene:

- Microplaca de 96 pozos con anticuerpo monoclonal específico para IL-1 $\alpha$
- 1 vial con 12 mL de anticuerpo policlonal marcado con peroxidasa (conjugado)
- 1 vial con 1,5 ng de estándar de IL-1 $\alpha$  de ratón
- 1 vial del control recombinante de IL-1 $\alpha$
- 1 Frasco de 12,5 mL diluyente de muestra
- 1 Frasco de 21 mL del diluyente del calibrador
- 1 Frasco de 12,5 mL Reactivo A peróxido de hidrogeno
- 1 Frasco de 12,5 mL Reactivo B cromógeno (tetrametilbenzidina)
- 1 Frasco de 23 mL de Solución Stop

Procedimiento:

- Se atemperan todos los reactivos
- Se dispensa 50 uL del diluyente de muestra en cada pozo
- Se adiciona 50 uL del estándar, Control y Muestra al pozo correspondiente, y se incuba por 2 horas a temperatura ambiente
- Se realizan 5 lavados con 400 uL de la solución de lavado
- Se adiciona 100 uL del conjugado a cada pozo e incubar por 2 horas a temperatura ambiente
- Se realizan 5 lavados con 400 uL de la solución de lavado
- Se adiciona 100uL de sustrato a los pozos correspondientes e incubar 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz
- Se adiciona 100 uL de solución stop a todos los pozos
- Se realiza la lectura 450 – 630 nm

## **ANEXO N° 8**

### **Interleuquina 8, Invitrogen**

El Kit contiene:

- 1 vial (0,125 mg/0,125 mL) Coating Antibody
- 1 vial (0,00125 mg/0,125 mL) Detection Antibody
- 1 vial del Estandar
- 1 vial (0,1 mg/0,5 mL) Streptavidin-HRP conjugado
- 1 Frasco de 100 mL Coating Buffer A
- 1 Frasco de 100 mL Coating Buffer B
- 1 Frasco de 200 mL Assay Buffer
- 1 Frasco de 100 mL Wash Buffer
- 1 Frasco de 25 mL Cromógeno-sustrato
- 1 Frasco de 100 mL de Solución Stop

Procedimiento:

- Primero se sensibiliza la placa de ELISA de 96 pozos, con 100 uL por pozo con el Anticuerpo de Captura diluido en Coating Buffer y se incuba por 18 horas a 4°C.
- Al día siguiente se realiza 1 lavado con solución de lavado (400uL por pozo), luego se bloquea las placas con 300 uL de Assay Buffer por pozo, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente.
- Se remueve el exceso de líquido en papel absorbente, luego dispensar las muestras, 100 uL del estándar, control y muestras al pozo correspondiente e inmediatamente se adiciona 50 uL del anticuerpo de detección (working detection antibody) a cada pozo y se deja incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- Se realizan 5 lavados con 400 uL de solución de lavado
- Se agrega a cada pozo 100 uL streptavidina-HRP y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se realiza 5 lavados con 400 uL de solución de lavado
- Se adiciona 100 uL de sustrato (TMB), y se deja actuar 30 minutos en oscuridad
- Se añade 50 uL de solución stop a todos los pozos
- Se realizan las lecturas a 450-630 nm