

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO SELADIS**



**Efecto del Extracto de Alcaloides Totales de Evanta sobre
macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* In-vitro**

Elaborado por:

EDGAR TEDDY QUISPE SOTO

Asesora:

Dra. Jacqueline Calla de Magariños

TESIS DE ESPECIALIDAD

**La Paz – Bolivia
2012**

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, parasitaria causada por protozoarios flagelados del genero *Leishmania*, afecta al ser humano y a los animales, es transmitida por vectores de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*. En Bolivia esta presente principalmente en las zonas tropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando y Cochabamba. El tratamiento, se realiza con fármacos, como los antimoniales pentavalentes (glucantime), la anfotericina-B y la pentamidina, actualmente se está investigando el efecto de extractos de plantas, entre ellas se encuentra “*Galipea longiflora*”, sus extractos han demostrado tener actividad anti-parasitaria.

En el presente estudio evaluamos el efecto de EAE sobre la capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis* y sobre la capacidad microbicida de macrófagos murinos.

El estudio se realizo en macrófagos murinos derivados de médula Ósea obtenidos en el laboratorio. Estos macrófagos fueron infectados con *Leishmania braziliensis* y tratados con EAE, se evaluó el porcentaje de macrófagos infectados y el índice de fagocitosis.

Se observó que EAE disminuye un 44,6 % la capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis*; a las 48 horas se observo que no existe diferencias significativas en la capacidad microbicida comparado con el control y a las 72 horas observamos un incremento en el porcentaje de macrófagos infectados (32,4% $P=0,0005$) y en el Índice de fagocitosis (2,15 $P=0,003$) en los macrófagos no tratados con EAE, pero se observo un porcentaje e índice de fagocitosis bajos en los macrófagos que fueron tratados con EAE (6% y 1,2 respectivamente).

Concluimos que evanta reduce en un 44,6 % la capacidad infectiva en 24 horas con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, determinamos que el EAE disminuye la capacidad infectiva de *Leishmania* en sus dos estados promastigotes y amastigotes. Sobre la capacidad microbicida del macrófago determinamos que no existen cambios significativos a las 48 horas, sin embargo a las 72 horas determinamos que Evanta mantiene efectiva la capacidad microbicida del macrófago y atenúa los mecanismos de evasión del parasito

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	2
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	5
2.2.1 Clasificación.....	5
2.2.2 Ciclo biológico.....	6
2.2.3 Características bioquímicas y moleculares de <i>Leishmania</i>	9
a) Organización Genómica.....	9
b) Características Bioquímicas.....	9
2.3 RESPUESTA INMUNE INNATA EN LEISHMANIASIS.....	12
2.3.1 FAGOCITOSIS.....	14
2.4 MECANISMOS DE INFECCIÓN POR LEISHMANIA.....	16
2.4.1 GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA.....	18
2.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.....	19
2.5.1 Leishmaniasis visceral (LV).....	19
2.5.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	20
2.5.3 Leishmaniasis cutánea (LC).....	21
2.6 Tratamiento de la enfermedad.....	21
2.6.1 Antimoniales pentavalentes.....	22
2.6.2 Anfotericina B.....	22
2.6.3 Pentamidina.....	23
2.6.4 Miltefosina.....	23
2.7 MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN LEISHMANIA.....	24
2.7.1 Resistencia a antimoniales.....	25
2.7.2 Resistencia a anfotericina B.....	26
2.7.3 Resistencia a pentamidina.....	26
2.7.4 Resistencia a Miltefosina.....	26

2.8 Medicina tradicional.....	27
3. ANTECEDENTES.....	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
5. JUSTIFICACIÓN.....	33
6. OBJETIVO GENERAL.....	33
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
8. RESULTADOS.....	38
9. DISCUSIÓN.....	42
9. CONCLUSIONES.....	44
10. RECOMENDACIONES.....	45
11. BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Mapa de distribución de Leishmania en América.	3
Figura 2. Mapa de distribución de Leishmania en Bolivia	3
Figura 3. Flebótomos de la especie Lutzomyia	4
Figura 4. Clasificación Taxonómica de Leishmania	5
Figura 5. Forma promastigote de Leishmania	6
Figura 6. Forma amastigote de Leishmania	6
Figura 7. Ciclo de Leishmania en los hospedadores	8
Figura 8. Lípidos de membrana en promastigotes	10
Figura 9. Lípidos de membranas en amastigotes	11
Figura 10. Representación de los microtúbulos y orgánulos de Leishmania	12
Figura 11. Mecanismos microbicidas en fagocitos	14
Figura 12. Leishmaniasis visceral	20
Figura 13. Post-kala-azar	20
Figura 14. Leishmaniasis mucocutánea	20
Figura 15. Leishmaniasis cutánea	21
Figura 16. Algunos mecanismos de resistencia en parásitos	25
Figura 17. Extracción de la corteza de Evanta	27
Figura 18. Procedimiento de infección de macrófagos con <i>L. braziliensis</i>	37
Figura 19. Porcentaje de macrófagos infectados con <i>L. braziliensis</i>	38
Figura 20. Porcentaje de macrófagos infectados sin tratamiento	39
Figura 21. Porcentaje de infección a las 24 horas con EAE	39
Figura 22. Porcentaje de macrófagos infectados a las 48 horas	40
Figura 23. Porcentaje de infectividad a las 72 horas	40
Figura 24. Índice de fagocitosis	42

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

Tabla 1. Algunos Constituyentes de los gránulos lisosomales	15
Tabla 2. Determinantes invasivos / evasivos	18
Tabla 3. Clasificación taxonómica de Evanta	28
Tabla 4. Rendimiento y actividad leishmanicida de Evanta	29

DEDICATORIA:

A Dios, por permitirme continuar mis estudios.

A mi papá Manuel, Mama Julia y mis Hermanos Manuel y Nelson por el inmenso amor y apoyo brindado siempre.

A Jacky y Alan mi esposa e hijo muy queridos, por el apoyo y alegría que me brindan cada día y siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dra. Jacqueline Calla de Magariños, por haberme guiado en el camino de la Inmunología, por su apoyo, su entusiasmo, por ser un modelo de trabajo y sobre todo por su amistad.

A los docentes del Instituto SELADIS, quienes contribuyeron a mi formación profesional y también por la amistad brindada a mi persona.

A mis tribunales Dr. Alberto Giménez, Karina S. Delgado Flores y Efraín Salamanca por su tiempo y contribución en el presente trabajo.

Al Doctor Walter Magariños Loredó coordinador del Proyecto UMSA-ASDI/SAREC “Enfermedades Infecciosas Nuevas Estrategias Terapéuticas” por el apoyo en el desarrollo de la Tesis.

A todo el personal del Instituto SELADIS, administrativos, amigos residentes e internos con quienes compartimos gran parte del día durante los dos años de residencia.

A todos los docentes de mi querida Facultad por la enseñanza brindada para el desarrollo profesional.

Y todos mis amigos que me apoyaron en diferentes momentos.

1. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, parasitaria, con manifestaciones patológicas que difieren mucho, tanto en su presentación clínica como en su pronóstico. Esta enfermedad es causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, es una enfermedad del ser humano y los animales, endémica y es transmitida por vectores de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*⁽¹⁾.

En Bolivia fueron registrados entre 1983-2006 un total de 35714 casos de Leishmaniasis Tegumentaria, menos de 10 casos de Leishmaniasis visceral y cuatro casos de Leishmaniasis cutáneo difusa. Está presente en las zonas tropicales principalmente en los departamentos de La Paz, Beni, Pando y Cochabamba; según datos del Ministerio de Salud existe un incremento en el número casos por año desde 1983, entre las posibles causas de este incremento están la colonización de nuevas áreas geográficas donde se desarrollan proyectos socio económicos o de subsistencia, como también las mejoras en cuanto al diagnóstico y registro⁽¹⁾.

La Leishmaniasis ya era conocida por los pueblos preincaicos e incaicos. Llamado por los conquistadores españoles, “mal de los Andes”, clínicamente se presenta en las siguientes formas. Leishmaniasis Visceral, Mucocutanea y Cutánea⁽²⁾.

El tratamiento, se lleva a cabo con fármacos, tales como los antimoniales pentavalentes (glucantime), la anfotericina B y la pentamidina, y actualmente se está investigando el efecto de extractos de plantas (medicina tradicional) para su aplicación clínica con muy buenas expectativas⁽³⁾. Entre ellas *Galipea longiflora* (Evanta) es una planta que está siendo utilizada para el tratamiento de la Leishmaniasis. Es un árbol que se encuentra en las regiones amazónicas de Sud América que incluye a nuestro país; los extractos de Evanta han demostrado tener actividad antiparasitaria utilizados de manera tradicional⁽³⁾⁽⁴⁾, en infusiones o cataplasmas y también fueron demostrados en estudios científicos⁽⁵⁾. Basados en esta evidencia nosotros planteamos la hipótesis que la cura no solo se debe a la acción sobre el parásito si no a una combinación con algún efecto

sobre algunos componentes de la respuesta inmune. Nuestro equipo ya trabajo en las pruebas de citotoxicidad, efectos en la producción de Oxido Nitrico, TNF, INF en cultivos celulares, también sobre la respuesta proliferativa y producción de citoquinas en linfocitos de pacientes con Leishmaniasis, en la expresión del gen de INF γ en células murinas infectadas y tratadas con EVANTA ⁽⁵⁹⁾⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾. En el presente trabajo para estudiar esta acción sobre una parte de la respuesta inmune innata, evaluamos el efecto del Extracto de Alcaloides Totales de Evanta (EAE) sobre la capacidad microbicida del macrófago y los efectos sobre la capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, parasitaria, con manifestaciones patológicas que difieren mucho, tanto en su presentación clínica como en su pronóstico, es causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Es una enfermedad antropozoonótica (del ser humano y los animales), endémica y de transmisión vectorial. El conjunto de enfermedades denominadas Leishmaniasis, presentan una gran variedad de reservorios, según la especie de *Leishmania* involucrada, pudiendo ser: caninos, roedores, desdentados (como el oso hormiguero) y marsupiales (como la comadreja)⁽¹⁾.

Se encuentra presente en 88 países, 72 de los cuales se encuentran en vías de desarrollo y 13 de los más pobres del mundo. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen, entre 12 a 14 millones de casos distribuidos en el mundo y cada año se declaran aproximadamente 1.6 millones de nuevos casos de los cuales solo unos 600 000 son reportados ⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

La Leishmaniasis tegumentaria americana (Fig.1) ya era conocida por los pueblos preincaicos e incaicos. Llamado por los conquistadores españoles, “mal de los Andes”. La enfermedad recién fue identificada en el siglo XIX. En el año 1885, Cunningham observa por primera vez el parásito y en 1903 Leishman, Donovan y Wright dan una

descripción detallada del mismo a partir de muestras obtenidas de pacientes, que presentaban diversas ulceraciones ⁽²⁾.

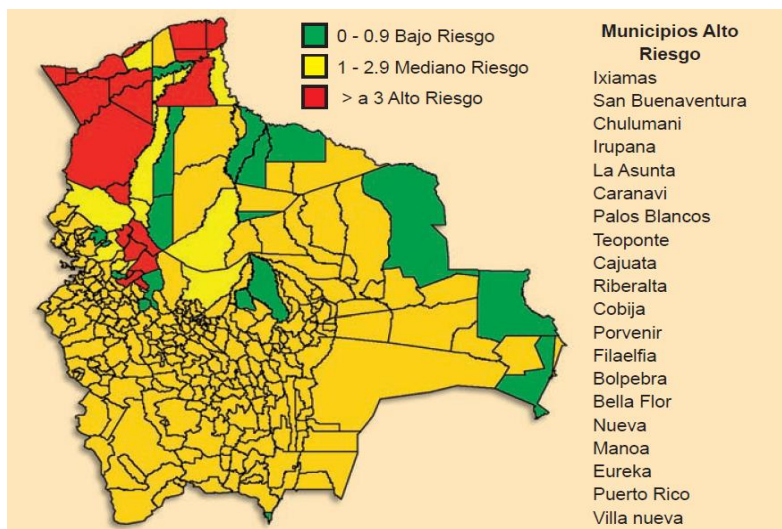


Figura 1. Mapa que muestra la distribución de la Leishmaniasis Cutánea y mucocutánea en el nuevo mundo.

(Tomada de http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/)

La Leishmaniasis en Bolivia (figura. 2) se encuentra geográficamente distribuida en el área rural de las zonas tropicales y subtropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca⁽¹⁾.

Figura 2. Distribución de Leishmaniasis en Bolivia



Mapa que muestra la distribución de Leishmania en Bolivia según el nivel de riesgo. (Tomada de LEISHMANIASIS. Guía operativa para el control en Bolivia-2007)

En los últimos 24 años (1983-2006), fueron registrados en el país 35.714 casos autóctonos de Leishmaniasis Tegumentaria Americana, menos de 10 casos de Leishmaniasis visceral y 4 casos de Leishmaniasis cutáneo difusa⁽¹⁾.

Se ha podido certificar que circulan 4 especies parasitarias:

- *Leishmania braziliensis*
- *Leishmania amazonensis*
- *Leishmania chagasi*
- *Leishmania lainsoni*.

La primera especie es agente de la Leishmaniasis Cutáneo Mucosa (LCM); la segunda de Leishmaniasis Cutánea (LC) y Leishmaniasis Cutáneo Difusa (LCD), estas dos especies tiene un claro predominio en los índices epidemiológicos nacionales para la enfermedad; la tercera es agente de Leishmaniasis Visceral (LV) y la cuarta produce raros casos de Leishmaniasis Cutánea (LC), estas dos últimas especies generan casos clínicos esporádicos. El incremento de casos que se observa a partir del año 1983, tiene a la par de la expansión geográfica, la expansión de la enfermedad debido a los importantes movimientos poblacionales de colonización en nuevas áreas geográficas donde se desarrollan proyectos socio económicos o de subsistencia⁽¹⁾⁽²⁾.

Los parásitos del género *Leishmania* son heteroxénicos, alternando hospedadores vertebrados e insectos que se alimentan de sangre, de la subfamilia *Phlebotominae*, que actúan como vectores. En América la Leishmaniasis es transmitida por flebótomos del género *Lutzomyia*⁽⁹⁾ (*Karachâ*, en idioma Guaraní) (Fig. 3)



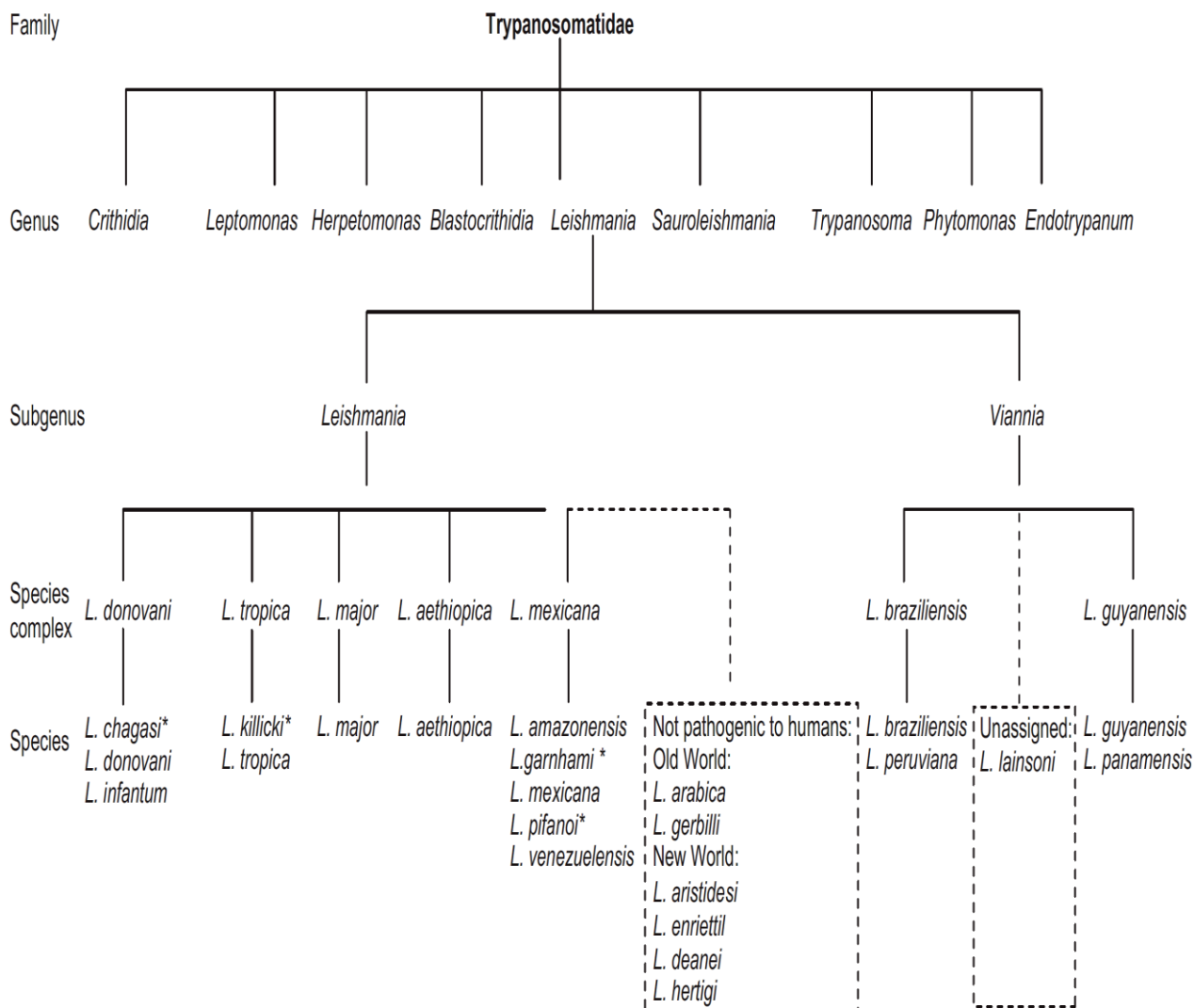
FIGURA 3. Flebótomos de la especie *Lutzomyia* Vistos al microscopio simple. Poseen unas dimensiones de Aproximadamente 2 a 3 mm, con el cuerpo y las alas cubiertos de pelos (Fuente: Maciel Juan et al.).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

2.2.1 Clasificación

En función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector, los parásitos del género *Leishmania*, se subdividen en dos subgéneros: el subgénero *Viannia* de multiplicación peripilórica y el subgénero *Leishmania* con desarrollo suprapilórico de los flagelados. En la figura 4 se muestra un esquema con la taxonomía del género *Leishmania*⁽⁸⁾.

Figura 4. Clasificación Taxonómica de *Leishmania*



*Species status is under discussion. *L. chagasi* in the New World is the same species than *L. infantum*

2.2.2 Ciclo biológico

Leishmania es un parásito digénico, es decir, realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado en su forma promastigote con un tamaño de 15-24 μm x 2-4 μm y un único flagelo (Fig. 5), y otra parte en el hospedador vertebrado, principalmente en los macrófagos, en forma aflagelar o amastigote con un tamaño de 2-3 μm (Fig. 6).



Figura 5. Forma Promastigote. Tinción Giemsa de un cultivo de *Leishmania*. (Leishmaniasis. Pereira y Perez M)

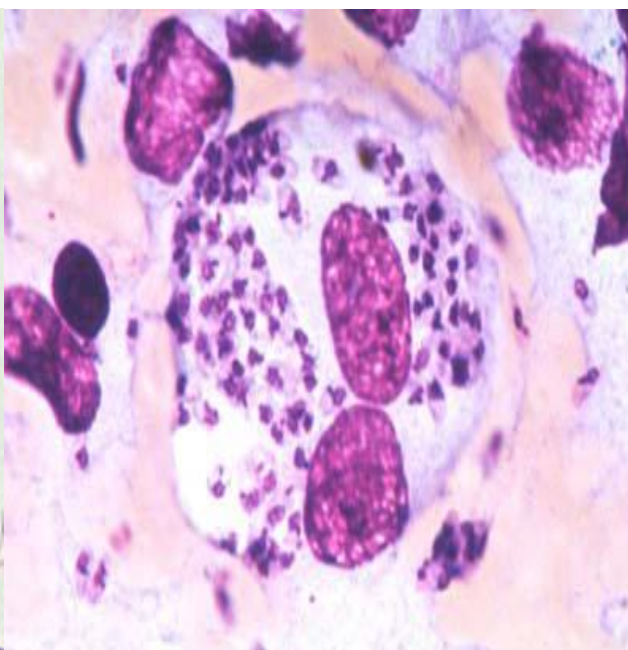


Figura 6. Forma Amastigote. Tinción Giemsa de un frotis de una biopsia esplénica. (www.who.int/tdr)

Cuando el flebótomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado, inocula, acompañado de su saliva, los promastigotes existentes en la probóscide.

Una vez que el parásito se encuentra en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, se produce fagocitosis por parte del macrófago, que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo, mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, entre otros el óxido nítrico y la liberación de Hidrolasas lisosomales vertidas en el interior de la vacuola parasitófora ⁽¹⁾ (11).

Leishmania evade estas reacciones inespecíficas del macrófago para sobrevivir y multiplicarse en su interior. La progresión de la enfermedad dependerá de si los amastigotes sobreviven a estas reacciones por parte de los macrófagos, de la virulencia del protozoo y de la eficacia de la respuesta inmune.

Las células parasitadas circulantes pueden ser ingurgitadas por otros flebótomos, en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes, para transformarse posteriormente en promastigotes. Cuando el promastigote se encuentra anclado en las vellosidades del tubo digestivo del flebótomo se le denomina *promastigote nectómona*.

Según va progresando hacia porciones anteriores del estómago, el cuerpo se hace más redondeado y el flagelo se engrosa y acorta. En esta etapa carece de capacidad infectiva y se le conoce con el nombre de *promastigote haptomona*. Aproximadamente entre ocho a diez días después de haber entrado en el insecto, el promastigote pierde la adherencia y el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo el promastigote ya no se multiplica, pero recupera el poder infectivo; en este momento se le conoce con el nombre de *promastigote metacíclico* (metaciclogénesis); en este momento el parásito se encuentran ya en la probóscide del flebótomo, pudiendo ser inoculadas a otro hospedador vertebrado, cerrándose así el ciclo⁽¹²⁾.

Una vez que el promastigote ha sido inoculado en el hospedador vertebrado el cuerpo se ovala; en esta fase al parásito se le denomina *paramastigote* ya en el macrófago, el amastigote adquiere la forma típica durante las primeras 24 horas (Figura 7)⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

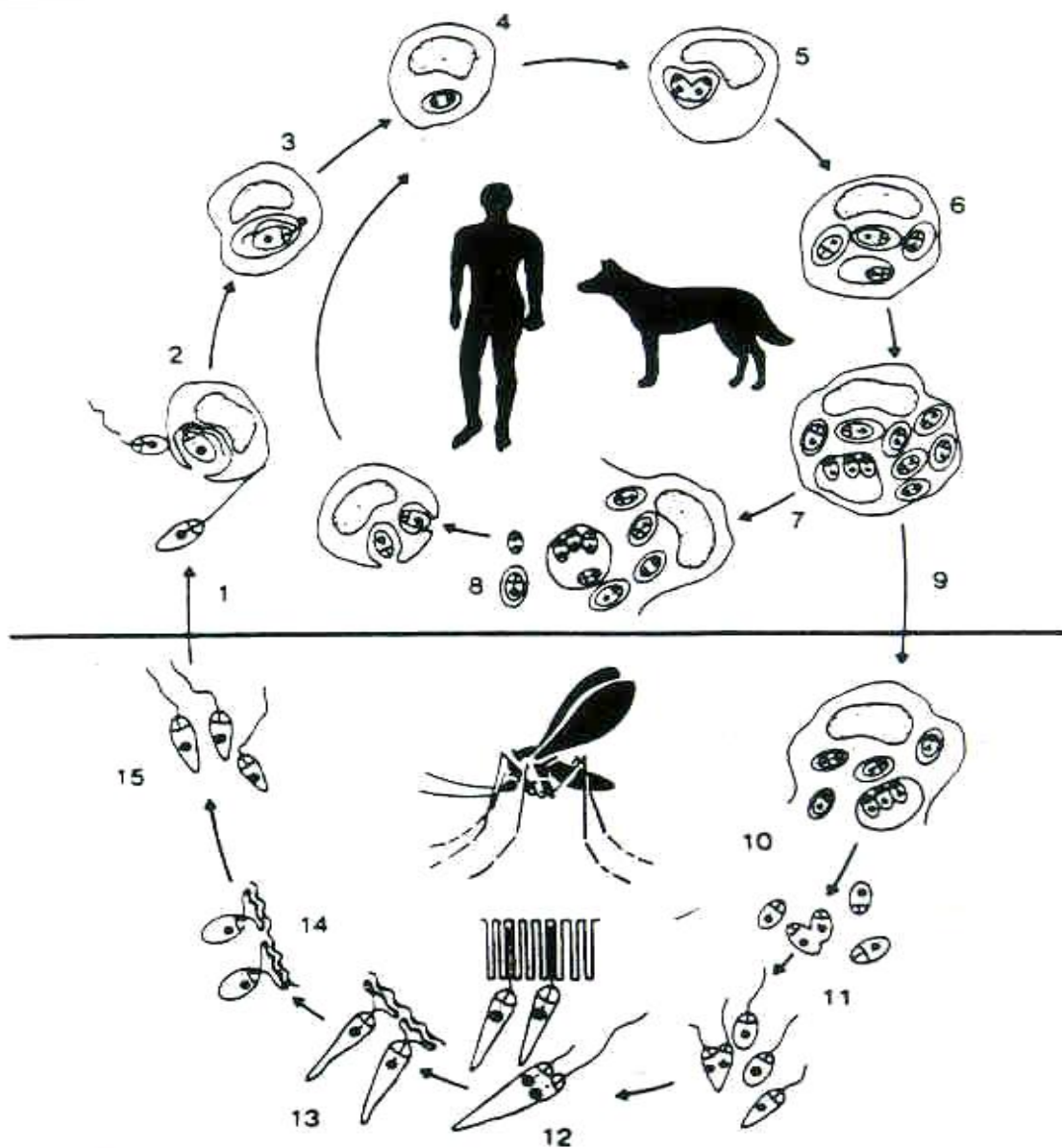


Figura 7. Ciclo de *Leishmania* en los hospedadores vertebrado e invertebrado

1.- Promastigotes en capilares sanguíneos después de la picadura del flebótomo. 2.- Adherencia y endocitosis de los Promastigotes 3.- Fusión del fagosoma y lisosoma. 4.- Diferenciación del promastigote en amastigote. 5.- Multiplicación del amastigote en la vacuola parasitófora. 6.- Multiplicación intravacuolar de amastigotes. 7.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes. 8.- Fagocitosis de amastigotes libres por otros macrófagos. 9.- Ingestión de macrófagos parasitados cuando el flebótomo ingurgita sangre. 10.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes en el tracto digestivo del flebótomo. 11.- Multiplicación de amastigotes y diferenciación en promastigotes. 12.- Multiplicación de promastigotes e inserción de flagelos entre los Micro-vellosidades del endotelio digestivo. 13.- Multiplicación en región pilórica e íleo con flagelos fijándose en la pared. 14.- Promastigotes con los flagelos unidos al intestino anterior. 15.- Promastigotes infectivos (metacíclicos) libres en la probóscide.

2.2.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LEISHMANIA

a) Organización Genómica

Los protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* poseen un ADN genómico (ADNg) localizado en tres compartimentos: en el núcleo como ADN cromosómico, en la mitocondria o kinetoplasto (ADNk) que se replica independientemente y es inusual en la naturaleza y en el citoplasma como ADN extracromosómico. El ADNk es rico en A+T (72-73%) a diferencia del ADN cromosómico rico en G+C (>60%)⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

b) Características Bioquímicas

Leishmania se desarrolla en dos ambientes totalmente diferentes durante su ciclo de vida. Los Promastigotes se desarrollan en el intestino del mosquito y utilizan aminoácidos y azúcares como principal fuente de energía en condiciones aeróbicas a 25-27 °C y pH=7. En cambio los amastigotes proliferan en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos del hospedador vertebrado a 37°C y pH= 4,5-5, siendo la principal fuente de energía los ácidos grasos de cadena larga, que son metabolizados por β -oxidación hasta CO₂ y agua⁽¹⁶⁾.

En el metabolismo de las purinas existen diferencias con el hospedador, puesto que *Leishmania* es incapaz de sintetizar de *novo* el anillo de purina a partir de precursores metabólicos y debe obtenerlo del hospedador. Es por esto que los parásitos han desarrollado un sistema de transporte de purinas desde el exterior muy activo y eficaz. Por el contrario si se ha descrito que *Leishmania* posee la maquinaria para la síntesis de pirimidinas^{(16) (17)}.

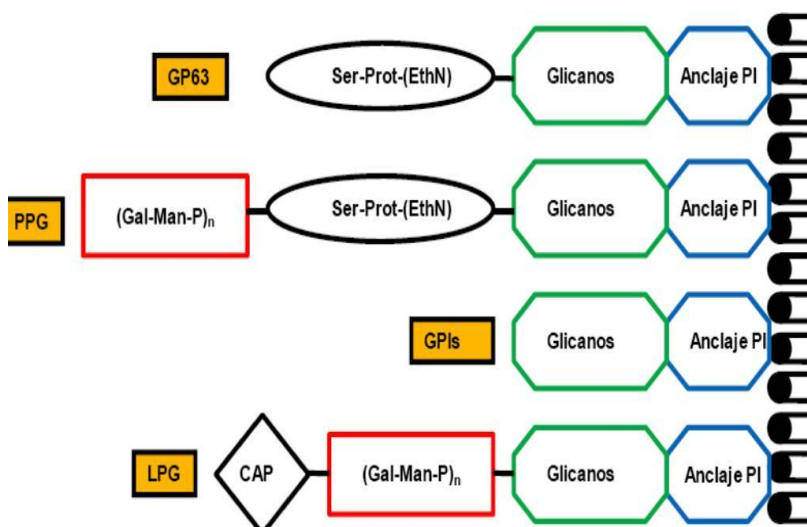
Los trypanosomatidos como *Leishmania* son auxotrofos para el hemo y necesitan tomarlo del exterior para cumplir sus necesidades metabólicas, este defecto en la síntesis de tetra pirroles se manifiesta por un requerimiento nutricional de hemo y hemoglobina o su precursor intermediario, la protoporfirina IX. El hemo es requerido

para la síntesis de diferentes hemoproteínas, por lo tanto necesita tomar de este metabolito cuando está presente dentro del insecto o dentro del macrófago.

La obtención de hemoglobina por parte de *Leishmania* es un proceso de endocitosis mediado por receptor, que es una hexoquinasa de 46 KDa que se encuentra ubicada en el bolsillo flagelar de donde es conducido hasta alcanzar los lisosomas para su degradación. Los requerimiento de hemoglobina puede sustituirse por hemina cuando se cultivan promastigotes de *Leishmania*.

Tanto el promastigote como el amastigote son células bien organizadas. La membrana plasmática es una bicapa lipídica y se encuentra tapizada por un glucocálix formado por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI) y relacionado con la capacidad invasiva del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocálix son una glicoproteína de 63 kDa (gp63), otra de 46 kDa (gp 46) y el lipofosfoglicano (LPG). (Fig.8)⁽¹⁶⁾

Figura 8 LÍPIDOS PRESENTES EN LA MEMBRANA PROMASTIGOTES



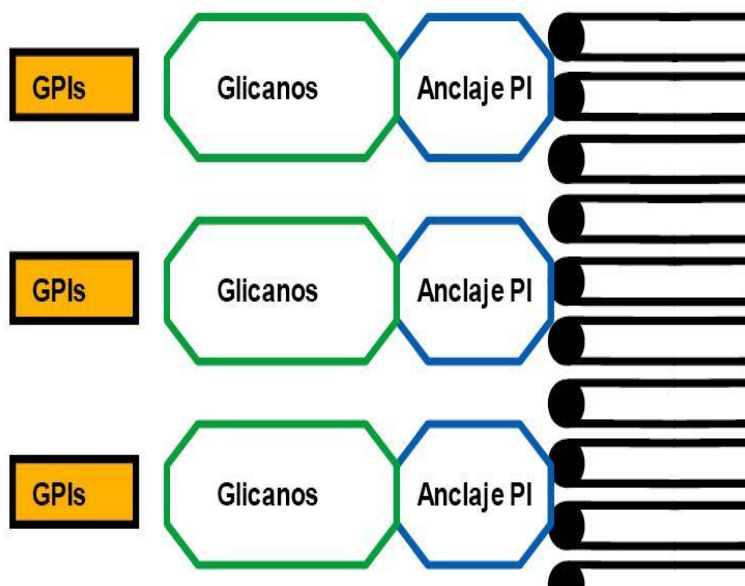
(GPis) glicosilfosfatidilinositol, (LPG) Lipofosfoglicanos, (Gp) Glicoproteína, (PPG) proteofosfoglicanos. (Fuente Campos J. 2008)

La glucoproteína de 63 kDa (gp63) es una metaloproteínasa polimórfica y conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. Está presente en las dos formas del parásito, alcanzando las 500.000 copias por célula en el promastigote. En los amastigotes aparece en menor número y localizada en el interior de lisosomas ⁽¹⁸⁾.

La glucoproteína de 46 kDa (gp 46) presenta unas 400.000 copias por promastigote. Está presente en el Subgénero *Leishmania*, pero no así en *Viannia*, siendo su principal característica la resistencia a la proteólisis ⁽¹⁹⁾.

El lipofosfoglicano (LPG) es otro glucoconjugado, implicado en el anclaje del parásito al macrófago y a las microvellosidades intestinales del insecto, y en la inhibición de la respuesta oxidativa y la producción de óxido nítrico por parte del macrófago. En el promastigote está presente en un número muy alto de copias, entre 1 y 1.5 millones por célula, sin embargo, en el amastigote es muy poco abundante ⁽²⁰⁾. Fig. 9

Figura 9. LÍPIDOS PRESENTES EN LA MEMBRANA DE AMASTIGOTES

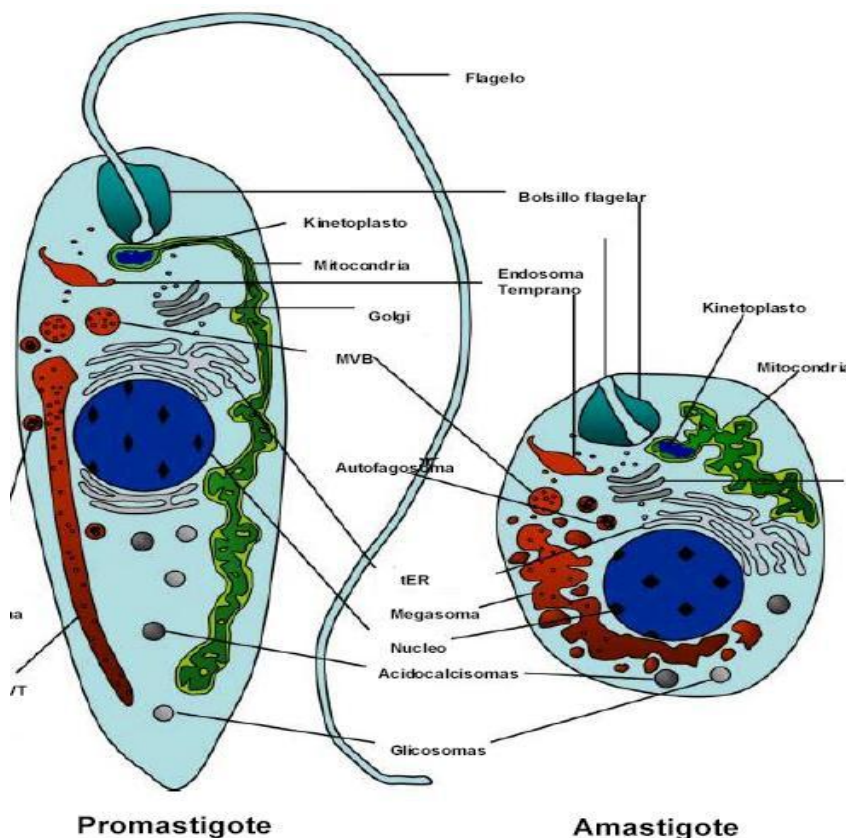


Fuente Campos J. 2008

Leishmania debajo de la membrana citoplasmática presenta una red de micro túbulos (Figura 10), que se extiende por todo el cuerpo celular, dejando libre la porción que corresponde al bolsillo flagelar sitio único y específico en el que se realizan procesos de

endo y exocitosis. Esta red proporciona una morfología estable y cierta movilidad contráctil ⁽²¹⁾.

Figura 10. REPRESENTACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS Y ORGÁNULOS QUE PRESENTA LEISHMANIA



Fuente Campos J. 2008

2.3 RESPUESTA INMUNE INNATA EN LEISHMANIASIS

Una vez inyectado 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. Inicialmente se instaura una respuesta inespecífica conocida como Respuesta Inmune Innata (RII) que, además de ejercer un control inicial de la infección puede influir en el direccionamiento del tipo de respuesta Inmune específica, ya sea una respuesta inmune celular o una respuesta de tipo humoral, lo que conlleva a resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Entre las células de la respuesta inmune innata, se encuentran Monocitos-Macrófagos,

neutrófilos eosinófilos, células NK y mastocitos, son células que migran a los tejidos en respuesta a un estímulo quimiotáctico, con excepción de los mastocitos presentes solo en tejidos ⁽²²⁾.

Expresan en su superficie receptores que facilitan su interacción con moléculas solubles, microorganismos y otras células, estas presentan gránulos en su citoplasma, en cuyo interior se encuentran proteínas y enzimas que al ser liberadas son nocivas para los microorganismos y los tejidos ⁽²²⁾.

El sistema inmune innato reconoce dianas no modificables propias de los microorganismos:

- RNA Vírico
- Lipopolisacaridos (LPS)
- Ácidos teicóicos
- Proteínas microbianas que inician por N-formil-metionina
- Oligo sacáridos que tienen mucha manosa en glucoproteínas microbianas

Los componentes de la RII reconocen características de los patógenos microbianos que no están presentes en células de los mamíferos ⁽²³⁾⁽²⁴⁾. Estos productos microbianos reciben el nombre de Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores que se unen a estas estructuras son los receptores para el reconocimiento de patrones (RRP). Entre los receptores presentes en Monocitos-Macrófagos están los receptores de Tipo Toll (del 1 al 9) presentes en la membrana plasmática y endosómica, las Lectinas de Tipo-C como los receptores de manosa presente en la membrana plasmática, los receptores fagocíticos presentes en la membrana plasmática, receptores N-Formil-Metionina en la membrana plasmática y por último los Nod Like presentes en el citoplasma ⁽²²⁾⁽²³⁾.

Las funciones de estos receptores principalmente en fagocitos mononucleares y linfocitos NK, son la de transmitir señales para activar funciones antimicrobianas y pro inflamatorias, a través de activaciones enzimáticas que logran producir la activación de factores de transcripción para una posterior transcripción de genes y expresión de

citoquinas pro inflamatorias, quimioquinas moléculas de adhesión endotelial, moléculas co-estimuladoras y citoquinas antivíricas⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾.

2.3.1 FAGOCITOSIS

Es un proceso activo que requiere gasto de energía, que permite envolver partículas con un diámetro superior a 0,5 μm a través de receptores que reconocen PAMPs o que reconocen proteínas propias que opsonizan como el complemento, anticuerpos (Ac) y lectinas entre otros. Estos receptores emiten señales activadoras que estimulan las actividades microbicidas de los fagocitos.

La destrucción de microorganismos se realiza por dos mecanismos dependientes e independientes de oxígeno (Fig.11). Los mecanismos dependientes de O_2 producen radicales libres como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radicales hidroxilo, que son producidos por la NADPH Oxidasa y la superóxido dismutasa (SOD)⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾.

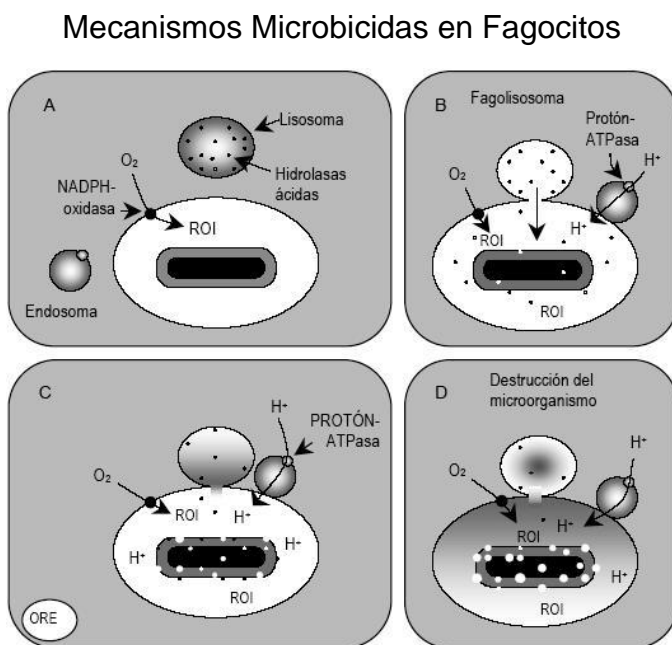


Fig.11. Las células fagocíticas destruyen microorganismos a través de mecanismos dependientes e independientes de oxígeno los primeros incluyen la participación de los radicales libres de O_2 (ROI) generados por el sistema NADPH-oxidasa. Los mecanismos independientes de oxígeno incluyen las hidrolasas lisosomales y a péptidos y proteínas microbicidas. (Fuente. Rojas-Espinosa Oscar)

En cuanto a los mecanismos no dependientes de oxígeno ocurre cuando los microorganismos son endocitados y como consecuencia de la fusión entre fagosomas y los gránulos citoplasmáticos, estos se ponen en contacto con las enzimas hidrolíticas contenidas en los gránulos citoplasmáticos (Tabla1), enzimas que requieren un pH ácido para ser activas ya que a pH neutro la mayoría de las enzimas se encuentran como zimógenos inactivos. Se ha comprobado que la acidificación del fagolisosoma se logra gracias a la actividad de una bomba de protones (protón ATPasa), que se incorpora a la membrana de la vacuola digestiva al ocurrir la fusión fago-lisosomal⁽²²⁾⁽²⁴⁾.

Tabla1. ALGUNOS CONSTITUYENTES DE LOS GRÁNULOS LISOSOMALES

CONSTITUYENTE	GRÁNULOS PRIMARIOS	GRÁNULOS SECUNDARIOS
Hidrolasas Ácidas	Catepsina B Catepsina D B-glucoronidasa	Fosfatasa A2
Proteasas Neutras	Elastasa Proteinasa 3	Colagenasa Activador de complemento
Factores Microbicidas	Mieloperoxidasa Lisozima Defensinas Factor Incrementador de la permeabilidad	Lisozima Lactoferrina

Fuente: Rojas-Espinosa Oscar y col.

Por último cabe señalar un mecanismo citotóxico de los macrófagos que es la generación de óxido nítrico que se origina a partir del metabolismo de la L-arginina y su producción se regula por efecto de algunas citoquinas como el interferón γ (INF γ). Esta producción se puede inducir experimentalmente estimulando a macrófagos con lipopolisacáridos (LPS). El óxido nítrico (NO) es producido por la enzima Sintetasa inducible de Óxido Nítrico (iNOS) no está presente en monocitos y macrófagos inactivos y se induce como respuesta a productos microbianos que activan a receptores de tipo

Toll y sobre todo en conjugación con IFN γ como se menciona anteriormente, este NO puede reaccionar con el anión superóxido o el radical hidroxilo para dar lugar a radicales peroxinitrito muy reactivos, este mecanismo es el principal responsable de la destrucción de microorganismos de vida intracelular (*Leishmania*, *M. tuberculosis*, *Brucella abortus*)⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾.

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, la tendencia actual es conceder igual importancia a las células de la RII al ser ellas las que primero entran en contacto con el parásito⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾.

2.4 MECANISMOS DE INFECCIÓN POR LEISHMANIA

Algunas especies de *Leishmania* son organismos patógenos, el grado de patogenicidad de estos parásitos, tradicionalmente se define como “virulencia” y se manifiesta como un espectro de síntomas clínicos de la enfermedad en los humanos.

Aunque la virulencia de *Leishmania* puede ser modulada por factores ambientales y genéticos, así como por su hospedador vertebrado y por los vectores. De la misma manera los determinantes antigénicos y moleculares de *Leishmania* han sido asociados con la virulencia de estos parásitos, ya que no es posible una Leishmaniasis sin infección por parásitos intactos vivos.

Leishmania posee moléculas en su superficie que están relacionadas con la infección denominados determinantes invasivos/evasivos, los cuales le permiten a éstos parásitos establecerse exitosamente en el fagolisosoma o vacuola parasitófora de los macrófagos.

Este parasitismo intracelular conlleva una serie de eventos:

- Evasión de los factores líticos del suero
- Enlazamiento de parásitos al macrófago seguido por la entrada a la célula fagocítica.
- La sobrevivencia intracelular de los parásitos endocitados.
- Diferenciación de promastigotes a amastigotes.

➤ Replicación de los amastigotes en el interior celular.

El macrófago tiene la capacidad de eliminar los parásitos intracelulares por mecanismos como el estallido respiratorio, acidificación del medio y la digestión enzimática sin embargo *Leishmania* logra evadir los mecanismos de defensa de la célula huésped para desarrollar la infección⁽³¹⁾⁽³²⁾.

El peróxido de hidrógeno producido en el estallido respiratorio es degradado por catalasas o peroxidasas a oxígeno y agua, por lo que esta vía de destrucción resulta ineficaz en la mayoría de las ocasiones, ya que la *Leishmania* en su superficie posee una serie de proteínas, las cuales además de estar involucradas en la unión de los promastigotes al macrófago, están directamente implicadas en la protección contra las enzimas lisosomales⁽²⁹⁾⁽³¹⁾⁽³²⁾.

Otro de los mecanismos microbicidas propuesto en la actualidad como, es la generación de óxido nítrico sintetizado por la enzima óxido nítrico sintetasa, la cual es inducible a través de determinadas citocinas, los estudios han demostrado que los macrófagos murinos pueden producir suficiente óxido nítrico para destruir *Leishmania in vitro* en la actualidad se sospecha que el grado de activación macrofágica depende del destino metabólico de la L-arginina en los macrófagos, ya que este aminoácido es el sustrato común para las enzimas arginasa y óxido nítrico sintetasa, las cuales son inducidas dependiendo del tipo de células CD4 donde actúen⁽²⁸⁾.

Como mencionamos anteriormente los promastigotes de *Leishmania* están cubiertas por glicoproteínas (Tabla 2), donde la manosa es el componente mas abundante de estas moléculas, allí se encuentran presente varias clases de fosfatidilinositol o moléculas de anclaje tales como: lipofosfoglicano o LPG, un pequeño grupo de glicoinositolfosfolípidos (GIPLS), proteínas con GPI como la GP63 y proteofosfoglicanos (PPGs), los cuales constituyen otro mecanismo de defensa contra el estallido respiratorio⁽²⁸⁾.

Las moléculas ubicadas en la superficie del parásito y denominadas determinantes invasivos/evasivos, son cruciales para la infección pero no producen patología en el huésped.

Las moléculas más estudiadas y relacionadas con la virulencia en *Leishmania* han sido la GP63 y LPG. La GP63 ayuda a los promastigotes contra la lisis por complemento también ayuda junto con la LPG al enlazamiento de los parásitos al macrófago y su entrada a la célula. Ambas proteínas pueden ser importantes para la sobrevivencia del parásito dentro del fagolisosoma⁽²⁹⁾⁽³¹⁾⁽³²⁾.

Glicofosfatidil Inositol	Glicoproteína GP63
Glicosil Fosfolípidos	Proteasas de Cisteína
Lipofosfoglicanos	Histonas
Fosfoglicanos	ATPasas
Proteofosfoglicanos	

(Fuente: Rodriguez N.)

2.4.1 GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA

Debido al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y de trasfección genética se han podido adelantar estudios que involucran directamente a algunos otros genes en los procesos de virulencia en *Leishmania*, en este sentido podemos mencionar los genes que codifican para las proteína disulfido isomerasa, fosfomanosa isomerasa y Ca₂+ATPasa, Cistein - proteinasa-B, Gp63, LPG, GPD manosa piro-fosforilasa, fosfomanomutasa, fosfo manosa isomerasa y Transportador de GPD-manosa⁽³¹⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾.

En cuanto a la Ca²⁺ ATPasa del retículo endoplasmático, se ha demostrado que esta proteína esta involucrada en los fenómenos de virulencia de *L. mexicana* y *L. braziliensis*, ya que su sobre expresión en el parásito “no virulento” incrementa la virulencia al producir lesiones en ratones Balb/c en un periodo de tiempo similar al de los clones virulentos así mismo se incrementa su enlazamiento al macrófago tanto como su penetración y sobrevivencia⁽³¹⁾.

Es posible visualizar el fenómeno de la virulencia en *Leishmania* por la vía de la expresión diferencial o diferencias cualitativas de los determinantes evasivos/invasivos y patoantigénicos.

La virulencia se manifiesta en el aspecto clínico como un espectro de enfermedades humanas con diferente severidad que van desde las afecciones asintomáticas a la aparición de nódulos que curan espontáneamente, lesiones necróticas localizadas, muco cutáneas y lesiones difusas hasta las formas viscerales que son las más fatales.

La regulación positiva o negativa de grupos o de determinantes individuales, cualitativa o cuantitativamente pueden resultar en el espectro de síntomas clínicos que se observan en la enfermedad, en los escenarios extremos se encuentran la infección asintomática y la infección fatal, lo cual puede ser debido a la expresión variable de los determinantes. Los determinantes del huésped y del vector indudablemente están involucrados en un papel secundario o pasivo en las condiciones naturales ⁽²⁶⁾.

2.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Existen más de 20 especies de *Leishmania* ⁽¹⁾ que presentan diferentes manifestaciones clínicas en el ser humano, que pueden ser agrupadas en: Leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea.

2.5.1 Leishmaniasis visceral (LV)

Es la forma más severa de la enfermedad. Es producida por *L. donovani* y *L. infantum* (*L. chagasi* en América). Otras especies cutáneas, como *L. tropica*, pueden localizarse ocasionalmente en viseras. El periodo de incubación suele ser de unos dos meses, aunque puede llegar a los dos años, y la sintomatología es secundaria a la invasión de los órganos diana: bazo, hígado, médula ósea, mucosa intestinal, etc. (**Figura 12**). Además de fiebre, leucopenia y hepatoesplenomegalia, pueden aparecer diarrea, tos y pérdida de peso. Si no se trata, la mortalidad llega a alcanzar el 90%. Se distinguen la LV antroponótica o kala-azar producida por *L. donovani* y la LV zoonótica causada por *L. infantum*. Meses o años después de la forma antroponótica, aparentemente curada,

pueden aparecer placas hipopigmentadas o nódulos indurados por la piel, conocida como leishmaniasis dérmica post-kala-azar, generalmente debida a un tratamiento ineficaz ⁽⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁵⁾ (**Figura 13**) .

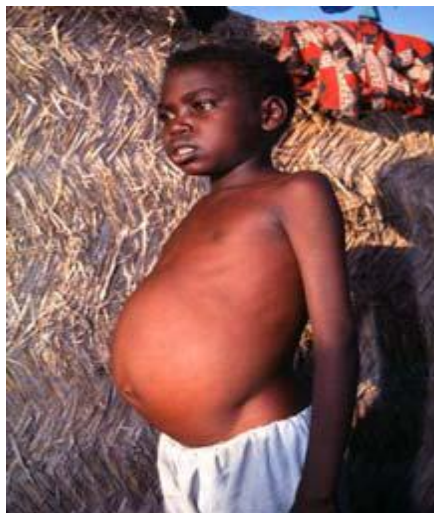


Figura 12. Leishmaniasis Visceral con esplenomegalia y abdomen distendido. (www.who.int/tdr)



Figura 13. Post-kala-azar afectando severamente al Rostro. (www.who.int/tdr)

2.5.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Después de una lesión cutánea en cualquier parte del cuerpo, las Leishmanias pueden metastizar por vía linfática hacia la oro-nasofaringe produciendo perforación del tabique, llegando a afectar al paladar, dorso nasal, labio superior y pómulos (**Figura 14**). Los agentes causales son *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* (sólo causa LMC por contigüidad con la lesión inicial), excepcionalmente *L. infantum* y *L. major* ⁽⁸⁾⁽³⁶⁾.



Figura 14. Leishmaniasis mucocutánea, afectando al tabique nasal. www.who.int/tdr

2.5.3 Leishmaniasis cutánea (LC)

Puede producir un gran número de úlceras en las partes expuestas de la piel, tales como el rostro (**Figura 15**) y extremidades, causando importantes discapacidades en los pacientes. Las lesiones tienden a curar de forma espontánea. Los agentes causales son *L. major*, *L. tropica* (algunas formas cutáneas por *L. tropica* se complican y la tendencia a recidivar y ulcerarse se repite a lo largo de la vida), *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* (esta última puede también producir la leishmaniasis cutánea difusa, que no cura espontáneamente y es muy complicada de tratar). Las LC son las más frecuentes y representan entre el 50-75 % de todos los casos⁽⁸⁾⁽³⁶⁾.



Figura 15. Leishmaniasis cutánea (LC) localizada, forma ulcerada, bordes nítidos y sobreelevados. (Dr. Ortis manual de leishmaniosis)

2.6 Tratamiento de la enfermedad

El tratamiento de la *Leishmaniasis* se lleva a cabo con fármacos como los antimoniales pentavalentes, anfotericina B, pentamidina y la miltefosina, aunque la posología y la vía de administración difiere según los casos. La toxicidad asociada a estos fármacos leishmanicidas de uso común, junto con la aparición de fenómenos de resistencia a los mismos, ha originado la necesidad de obtener nuevos fármacos de diverso origen, como alternativa terapéutica⁽¹⁾⁽⁸⁾⁽³⁶⁾.

2.6.1 Antimoniales pentavalentes.

Son los compuestos de primera elección y los más extensamente usados en la terapéutica de la enfermedad desde hace 40 años. El grupo consta de dos formas comerciales: Pentostam® (estibogluconato sódico) y Glucantime® (antimoniato de meglumina). El principal efecto es un descenso en los niveles de ATP del parásito, debido a la alteración de la glucólisis y de la oxidación de ácidos grasos⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾.

La dosis de fármaco empleada depende del contenido en antimonio (Sb) de éste. La O.M.S. recomendó en 1982 la administración de 20 mg/Kg/día de Sb por vía venosa, con un máximo al día de 850 mg de Sb; sin embargo, la baja acumulación del fármaco en la piel, puede ocasionar variación en la posología. Además, el uso generalizado de los antimoniales con dosis inadecuadas para el tratamiento de la leishmaniasis canina podría ser uno de los orígenes de la aparición de resistencias⁽¹⁾⁽⁸⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

2.6.2 Anfotericina B

Es el fármaco de segunda elección después de los antimoniales pentavalentes. Se trata de un antibiótico macrocíclico de bajo espectro derivado de *Streptomyces nodosus*, cuyo modo de acción se basa en su unión al ergosterol de la membrana del parásito, produciendo alteraciones en la permeabilidad de la misma con pérdida de metabolitos⁽⁸⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

Sus efectos colaterales adversos en el paciente han hecho de la anfotericina B un fármaco empleado principalmente en casos de leishmaniasis visceral recidivante y en áreas de alta resistencia a antimoniales. No obstante, en los últimos años se han desarrollado nuevas formulaciones del compuesto conjugado con lípidos, lo que ha mejorado su índice terapéutico, además de una disminución significativa de los efectos tóxicos en humanos. Estas moléculas lipídicas engloban medicamentos y liberan su contenido de manera retardada. El sistema utilizado más básico es el Complejo Lipídico de Anfotericina B (ABLC), formado por complejos lipídicos de 1600 a 6000 nm unidos a

la anfotericina B en forma de madejas. Los liposomas son los sistemas de dispersión más utilizados. Son vesículas de un diámetro menor de 100 nm, con una gran estabilidad, una vida media larga y sus efectos colaterales son mínimos ⁽⁸⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

2.6.3 Pentamidina

En los casos más resistentes a los antimoniales pentavalentes, se usa como sustituto a los mismos. Inhibe la síntesis de proteínas y fosfolípidos (Berman, 1988; 1997; Mesa-Valle et al., 1997), se une a regiones del ADN ricas en AT de forma reversible (Johnson et al., 1998), produce un descenso en los niveles de ornitina, arginina y putrescina, siendo uno de sus blancos terapéuticos la síntesis de poliaminas (Basselin et al., 1996; 1997a), y produce el colapso del potencial de membrana mitocondrial (Vercesi y Docampo, 1992; Basselin y Robert-Gero, 1998). Sus efectos secundarios son más severos que los del grupo de los antimoniales, acumulándose en hígado, cerebro y otros tejidos ⁽⁸⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

2.6.4 Miltefosina

Los análogos de la fosfocolina han sido utilizados como cancerostáticos para el tratamiento de las metástasis del cáncer de mama. La miltefosina es una molécula con buenas expectativas para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y del mal de Chagas ⁽⁸⁾⁽³⁸⁾⁽⁴⁰⁾. Su acción se basa en la estimulación tanto de los linfocitos T como de la acción microbicida de los macrófagos, pero a diferencia de los antimoniales, su actividad no es T-dependiente, por lo que podría ser un buen candidato para el tratamiento de enfermos coinfectados por *Leishmania*/VIH ⁽⁴⁰⁾.

Esta droga es utilizada para el tratamiento en pacientes con cáncer, y es el primer tratamiento oral en pacientes que no responden al tratamiento con los antimoniales y los pacientes que presentan co-infección con HIV ⁽⁴⁰⁾.

El modo de acción de la Miltefosina no se conoce a ciencia cierta, pero está asociado a cambios en el metabolismo de los alquil lípidos y la biosíntesis de los fosfolípidos. Miltefosina tiene efectos inmunomoduladores entre ellos actúa como co-estimulador en Linfocitos T y en macrófagos in vitro, potencia la producción de interferón gama (INF- γ) e induce la producción de Oxido Nítrico en macrófagos⁽³⁸⁾.

2.7 MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS EN LEISHMANIA

En *Leishmania* sp. se conoce muy poco en relación con los mecanismos moleculares involucrados con la resistencia a fármacos, pero existen mecanismos potenciales que están presentes en bacterias y eucariotes superiores (Fig.16), que pudieran estar implicados en la generación de resistencia en estos parásitos, entre estos:

- Sobre producción de la proteína blanco de acción del fármaco
- Mutaciones puntuales en la proteína blanco de acción del fármaco
- El fármaco es eliminado del interior celular
- El fármaco no entre a la célula debido a modificaciones a nivel de la membrana plasmática
- La célula posee una ruta metabólica alterna para compensar el efecto metabólico del fármaco.
- Las enzimas que convierten el fármaco a su forma activa son inhibidas.
- La célula podría excretar alguna enzima al medio extracelular y degradar el fármaco.

Sin embargo no debemos descartar la presencia de otros mecanismos de resistencia aun por conocer⁽⁴¹⁾.

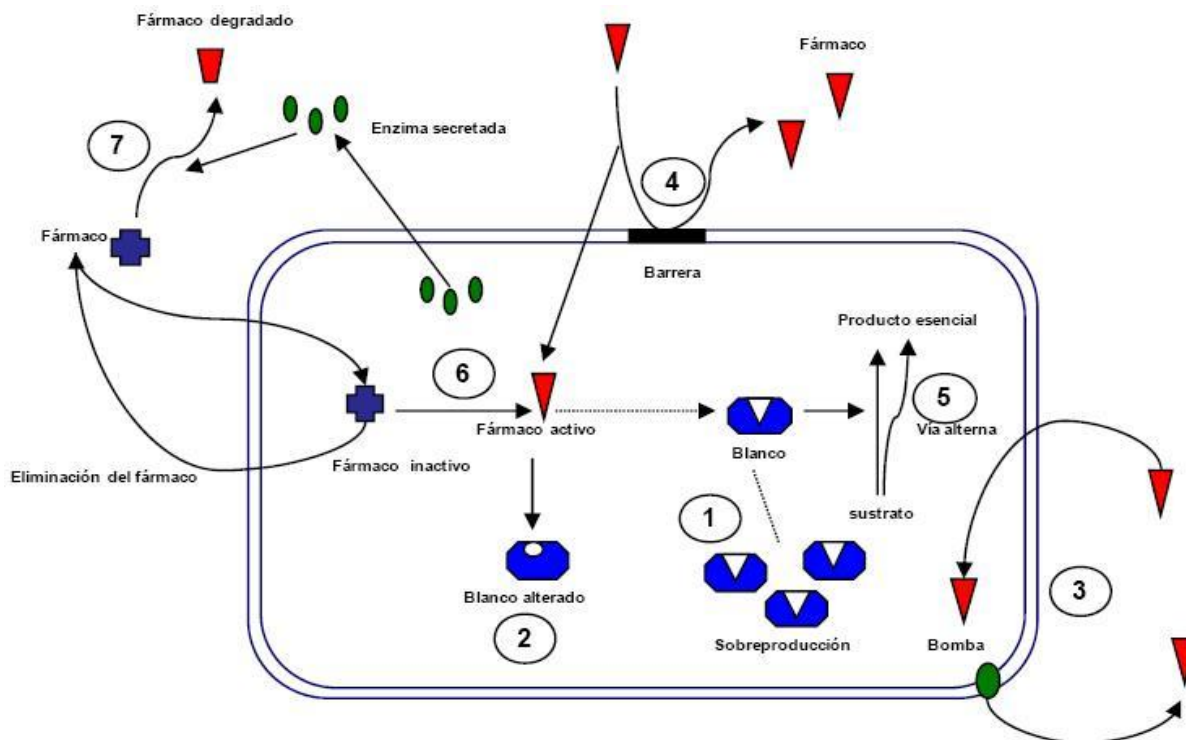


Figura 16. Algunos de los mecanismos de resistencia que pueden darse en protozoarios parásitos. (Ghannoum and rice 1999)

2.7.1 Resistencia a antimoniales

El antimonio orgánico pentavalente Sb^V es el fármaco de primera línea usado desde hace seis décadas. Se han descrito diversos mecanismos que explican la aparición de resistencia:

- Disminución de la reducción biológica de Sb^V A Sb^{III}
- Una disminución de la aquagliceroporina 1, proteína responsable de la entrada de Sb^{III} .
- El incremento en los niveles de tripanotión, debido al aumento en la actividad de las enzimas limitantes de la síntesis de este tiol, la γ -glutamylcisteinsintetasa y/o ornitina descarboxilasa.
- El secuestro intracelular del Sb^{III} acompañado por tioles, mediado por la sobreexpresión de PgpA, un transportador perteneciente a la familia ABC.
- El eflujo de Sb^{III} acompañado con tioles mediado por un transportador aun desconocido.

Se han descrito aislados clínicos resistentes a antimoniales, que presentaban altos niveles de tioles que fue debido a la amplificación de la enzima tripanotion reductasa y el gen MRPA⁽⁴²⁾.

2.7.2 Resistencia a anfotericina B

Se sabe que este fármaco interactúa con los esteroides (ergosterol) de la membrana plasmática de los hongos. En estudios In Vitro se seleccionaron promastigotes de *Leishmania donovani* resistentes a anfotericina-B, en estas células no observaron amplificación de genes PGP, pero la membrana plasmática presentaba un incremento significativo en la fluidez de la membrana debido a cambios en su composición lipídica incluyendo el precursor del ergosterol⁽⁴³⁾.

2.7.3 Resistencia a pentamidina

Las líneas resistentes a pentamidina se caracterizan por presentar una menor acumulación de fármaco. Este fármaco entra en el parásito a través de un transportador específico, denominado LmexPT1, localizado en la membrana plasmática, no existiendo modificaciones en dicho transportador como respuesta a la presión del fármaco, por el contrario a las líneas resistentes que presentan un potencial de membrana mitocondrial disminuido, el fármaco no se acumula tan rápidamente en la mitocondria, quedando libre en el citosol. Desde este lugar, sería eliminado por bombas activas, explicándose así la menor acumulación del fármaco observada en estas líneas de parásitos.⁽⁴⁴⁾

2.7.4 Resistencia a miltefosina

El primer caso de resistencia a miltefosina fue descrito en una sepa multiresistente de *L. trópica*, esta línea resistente contiene una amplificación y sobreexpresión de un gen de alta similitud al de la glicoproteína P (Pgp) humana⁽⁴⁵⁾.

Por otro lado líneas de *L. donovani* experimentalmente resistentes al fármaco por adaptación a concentraciones crecientes, han mostrado una acumulación reducida del fármaco debido a un defecto en la translocación del fármaco desde la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática⁽⁴⁶⁾.

El Transportador de miltefosina (LdMT), pertenece a la familia de ATPasas tipo P de aminofosfolipido translocasa. Se ha comprobado que mutaciones puntuales en distintas posiciones para cada uno de los dos alelos de esta proteína estaban implicadas en el fenotipo de resistencia. Además, el transportador de Miltefosina LdMT requiere el concurso de la subunidad beta LdRos3 para que se produzca la translocación del fármaco. Por lo tanto la disminución en la entrada de Miltefosina se consigue tras la modificación en la expresión o inactivación de cualquiera de las dos proteínas que forman parte de la maquinaria de translocación de Miltefosina⁽⁴⁷⁾.

2.8 Medicina tradicional

Galipea longiflora Krause KallunKi (Evanta)

Galipea longiflora Krause (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki,) tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta (Tabla 3). Es un árbol de hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos (Figura 17). En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos del Beni y La Paz. Un uso tradicional es en forma de infusión de corteza de Evanta en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos⁽⁴⁸⁾.

Figura 17. Extracción de la corteza de Evanta



Para el tratamiento de la Leishmaniasis o espundia, tradicionalmente se usa la corteza fresca o seca que es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones durante tres días dos veces al día⁽⁴⁸⁾.

En Bolivia la etnia tacana reconoce a Evanta como *Yaruma huana* existiendo dos clases de *Yaruma huana*, una clase es designada como *Yaruma huana epuna* (hembra) y la otra como *Yaruma huana d'ēja* (macho). Los árboles de *Yaruma huana epuna* han sido designados como *Gallipea Longiflora* y los árboles de *Yaruma huana d'ēja* como *Dexdropanax arboreus*⁽⁴⁸⁾.

Este género cuenta con unas cuarenta especies distribuidas en América en Guatemala, Cuba, Bolivia y el Sur de Brasil.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de Evanta

Reino	Vegetal
División	Magnoliophita
Sub clase	Rosidea
Orden	Sapindales
Familia	Rutáceae
Género	<i>Galipea</i>
Especie	<i>Longiflora krause</i>
Sinónimo	<i>Angostura longiflora</i> (Kallunki y pirani,1998)
Nombre común	Yuruma huana epuna

Revisada por: Salamanca E.

Entre los años 1985-91, un grupo de investigadores Franco-Boliviano, que trabajó en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), La Paz, Bolivia, confirmó la actividad antiparasitaria, de los extractos de la especie Evanta (*Galipea longiflora*), planta medicinal antiparasitaria utilizada por el pueblo Tsimane⁽⁵⁾.

Un total de 13 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, US4209519/15/04/93)⁽⁵⁾.

Se realizaron estudios farmacológicos en Bolivia, de extractos crudos de corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de *Galipea longiflora*, de donde se aislaron alcaloides 2-aril y 2-alquil quinolínicos estos con diferentes porcentajes de actividad leishmanicida, dentro de estos el 2-fenilquinolina se encuentre en mayor proporción en extractos crudos y es el que presenta buena actividad contra *Leishmania*⁽⁴⁹⁾. Tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento y actividad leishmanicida *in vitro* de alcaloides quinolínicos aislados de corteza de tronco, de raíz y hojas de *Galipea longiflora*.

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

CI₉₀= a) *L. braziliensis* (2903); b) *L. amazonensis* (PH8) y (H-142); c) *L. donovani* (2682) y (HS-70).

Fuente : Salamanca Efrain.

3. ANTECEDENTES

Existe evidencia que Evanta es utilizado en el tratamiento de la Leishmaniasis por habitantes que viven en zonas tropicales de nuestro país, como los Chimanes, lo usan en infusiones o en forma de cataplasmas, tratamientos documentados en nuestras farmacopeas tradicionales mencionando su eficacia en el tratamiento de la Leishmaniasis⁽³⁾⁽⁵⁾.

A. Fournet y colaboradores en 1993 demostraron la actividad Leishmanicida del extracto de corteza de tronco, corteza de raíz y hojas, de Evanta con una concentración de 100 µg/mL⁽⁴⁹⁾.

Fournet y colaboradores (1996) demostraron una reducción del tamaño de la lesión en un 74% y una disminución de la carga parasitaria del 90% Chimanina B en ratones Balb/c infectados con *L. amazonensis* (usaron 50 mg/Kg de peso)⁽⁵⁰⁾.

Tratamientos con Chimanina D obtuvieron un 87% de reducción de carga parasitaria en hígado usando 100 mg/Kg. Por otra parte el 2-n-propilquinolina redujo un 99,9% la carga parasitaria, en hígado, en un modelo experimental de *L. viseral* con 94 mg/kg de peso. Como referencia la droga utilizada de primera línea Glucantime, administrada por vía sub cutánea reduce la carga parasitaria en un 98% (100 mg/Kg de peso corporal)⁽⁵¹⁾

Existen estudios que permitieron saber más en cuanto a la infección de macrófagos humanos y murinos con el fin de explicar las interacciones moleculares entre macrófago-parásito sobrevivencia intracelular y multiplicación, mecanismos de infección-evasión ,producción de citoquinas, estimulación de moléculas de adhesión, o los mecanismos microbicidas⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾.

Existen estudios de efectos de extractos de plantas sobre macrófagos , como es el caso del efecto extracto alcohólico de *typified propolis* en promastigotes, como en amastigotes en macrófagos infectados con *Leishmania* elaborado por Copi D. y col en

el que demuestran que el extracto obtenido reduce la infección de macrófagos por *Leishmania amazonensis*⁽⁵⁶⁾.

El estudio realizado por Rios y col. demostraron que el aceite esencial de la manzanilla mostro ser activo contra amastigotes intracelulares pero no con amastigotes axenicos, por lo que sugieren que puede ser candidato a posteriores estudios en el desarrollo de medicamentos⁽⁵⁷⁾.

El estudio realizado con Flavonoides extraídos de *Vitex Negundo* (Verbenaceae) y *Fagopirum esculentum* (Polygonaceae) demostraron ser potentes antiparasitarios probados contra *L. donovani*, in vivo reducen la carga parasitaria en el bazo de roedores entre 80% a 90% con una concentración de 3,5 mg/Kg de peso⁽⁵⁸⁾.

Los Iridoides glucósidos como la Amarogentin aislado de *Swertia chirata* (gentianaceae), mostro buena eficacia en el tratamiento de la Leishmaniasis en hamsters infectados con *L. donovani*, reduciendo la carga parasitaria en bazo en un 90% tras la administración de 2,5 mg/Kg de peso por 6 días, no fue toxico tras el seguimiento de enzimas hepáticas⁽⁵⁸⁾.

Naphtoquinonas, el Plumbagin extraído de *Pera benensis* (Euphorbiaceae) muestra inhibición en el crecimiento de promastigotes y amastigotes de *L. donovani*, usado localmente fue tan potente como el Glucantime⁽⁵⁸⁾.

Taxoids como el 10-Deacetylbaocatin III aislado de *Taxus baccata* (Taxaceae) mostro una fuerte actividad contra amastigotes de *L. donovani*, que además probablemente estimule la producción de oxido nítrico y ese sea el mecanismo de acción⁽⁵⁸⁾.

Los glucósidos de acido Quinóvico aislados de *Nauclea diderrichii* (Rubiaceae) ejercen actividad antiparasitaria in vitro contra amastigotes intracelulares de *L. infantum* con concentraciones de 1,1 a 85 μ M. El alcaloide Cadambine fue también aislado mostrando actividad contra amastigotes intracelulares. Ambos, los glucósidos de acido Quinóvico y el Cadambine mostraron mecanismos diferentes el primero inhibe la

internalización del parásito y el segundo incrementa la producción de óxido nítrico en macrófagos⁽⁵⁸⁾.

Es importante resaltar el estudio realizado por Calla-Magariños J. y col. en el cual demuestran que el extracto de alcaloides totales de Evanta (EAE) a una concentración de entre 1-10 µg/mL no afecta la viabilidad celular; no incrementa la producción de Óxido nítrico ni del factor de necrosis tumoral (TNF), pero tampoco interfiere el rol de INF-γ como mediador de activación, en macrófagos J774 ante estímulos de INF-γ y Lipopolisacáridos (LPS); que disminuye la viabilidad del parásito en un 37%; y encuentran in-vitro una disminución en la producción de INF-γ de linfocitos T tratadas con EAE y estimuladas con anti-CD3 y ConA, lo que sugirió que el extracto puede ejercer control en el proceso inflamatorio crónico de la Leishmaniasis juntamente con su efecto Leishmanicida⁽⁵⁹⁾.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Leishmaniasis es considerada según la OMS una enfermedad emergente y olvidada, presente en 88 países, en la actualidad OMS estima que existen, entre 12 a 14 millones de casos distribuidos en el mundo y cada año se declaran 600 000 nuevos casos. En Bolivia entre 1983-2006 fueron registrados 35714 casos, y en La Paz el 2007 se registraron 1753 nuevos casos siendo el departamento con mayor incidencia en Bolivia⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

Esta presente en la amazonia y afecta principalmente a personas que trabajan y viven en estas regiones.

En Bolivia el tratamiento específico se basa en la administración de antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) y anfotericina B, tratamientos costosos y de difícil acceso para algunas regiones. En la actualidad el fracaso terapéutico se relaciona principalmente con la resistencia por parte del parásito y también a la toxicidad generada a nivel hepático, cardíaco y renal que presentan estos medicamentos.

Por lo que es necesario contar con nuevas estrategias no solo por que exista resistencia a los tratamientos actuales, también por tener tratamientos que no tengan

efectos colaterales tan severos y que además sean accesibles en las poblaciones afectadas.

5. JUSTIFICACIÓN

Se demostró ampliamente en la literatura científica, que un gran número de plantas poseen una diversidad química y bioactividad, en nuestro medio en el tratamiento de la Leishmaniasis se ha demostrado la eficacia de Evanta como medicina natural en el pueblo Chimán y también fue demostrada en estudios científicos realizados por Fournet y col. que alcaloides presentes en la planta son los responsables de la actividad leishmanicida⁽⁴⁹⁾, y en otros estudios se ha demostrado su baja toxicidad⁽⁵⁾.

Nosotros partimos con la hipótesis que la cura no solo se debe a la acción directa de la planta sobre el parásito, también puede deberse a una acción conjunta con efectos producidos sobre la respuesta inmune. En el marco del proyecto “Enfermedades Infecciosas Nuevas Estrategias Terapéuticas” ASDI-SAREC, el presente trabajo pretende evaluar el efecto del extracto de alcaloides totales de Evanta (EAE) sobre la capacidad microbicida de macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis* y sobre la capacidad infectiva del parásito y de esta manera contribuir a validar el uso de Evanta en el tratamiento de la Leishmaniasis en zonas endémicas.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del EAE en la infección de macrófagos murinos con *Leishmania braziliensis* in vitro

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto del EAE sobre la capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis*.

Evaluar el efecto del EAE sobre la capacidad microbicida del macrófago.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño o tipo de estudio

Experimental

7.2 Lugar de Estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Inmunología del instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés en La Paz – Bolivia.

7.3 MATERIAL

7.3.1 Equipos

Campana de Flujo Laminar (Enviroco Lw Scientific Inc)

Centrifuga (Eppendorf 5810)

Estufa (Fisher Scientific – Isotemp Incubator 655D)

Microscopio (Olimpus CH-2)

Balanza (Gibertini Italia)

7.3.2 Reactivos

Medio de cultivo RPMI

Medio de cultivo DMEN (Sigma)

Medio de cultivo M-199 (Sigma)

EAE

HEPES (Sigma)

Bicarbonato de Sodio

Glutamina (Gibco)

Penicilina Streptomycin (Gibco)

Suero Fetal Bovino (Sigma)

Piruvato (Gibco)

Adenina (Sigma)

Hemina (Sigma)
Biotina (Sigma)
Biopterina (Sigma)
Solucion PBS
Giemsa-Stain-Modified (Sigma)
Azul tripan
Acido clorhídrico 1 N
Alcohol al 70 %

7.3.3 Material Biológico

a) Línea celular L-929

Las células L-929 son una línea celular de Fibroblastos que fueron cultivados en medio RPMI, el sobrenadante del cultivo de estas células fue utilizado como fuente de factor estimulante de colonias Monocito/Macrófago, que fueron utilizados posteriormente en el proceso de maduración y diferenciación de células de médula ósea de ratón.

b) Macrófagos de Médula Ósea de Ratón

Se recuperaron células de la medula ósea de ratones Balb/c de 6-8 semanas de vida, a partir del femur; Posteriormente se realizaban tres lavados con medio RPMI, para luego resuspenderlo en 1 mL de DMEN suplementado al 20% con el sobrenadante del cultivo de células L-929

Se colocaron 1×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos que contenían cubre-objetos y fueron cultivados por 7 días, renovando el medio de cultivo cada 2 días. Al séptimo día se obtuvieron células maduras y diferenciadas con características morfológicas de Macrófagos.

c) *Leishmania braziliensis*

Se utilizaron promastigotes de *Leishmania braziliensis* (WHO - 2305), estos parásitos fueron cultivados en Medio-199 suplementado, para el estudio de la cinética de crecimiento en las condiciones ambientales de nuestro laboratorio, en una primera etapa se determinó la curva de crecimiento.

7.4 MÉTODO

7.4.1 Preparación de EAE

El EAE fue obtenido en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas -IIFB, este extracto se utilizó a una concentración de 10 µg/mL en medio DMEN concentración establecida en anteriores estudios⁽⁵⁹⁾.

7.4.2 Infección de Macrófagos con *Leishmania braziliensis* en presencia y ausencia de EAE.

Para la infección de macrófagos se procedió de la siguiente manera: en la placa de cultivo donde se encuentran los Macrófagos diferenciados y maduros, añadimos a todos los pozos 1 ml de medio DMEN suplementado, que contenían parásitos en una relación 1:20 y se incubó por 24 horas.

En cuanto al tratamiento con EAE se incluyeron las siguientes variantes (figura 18).

Dividimos en 4 grupos:

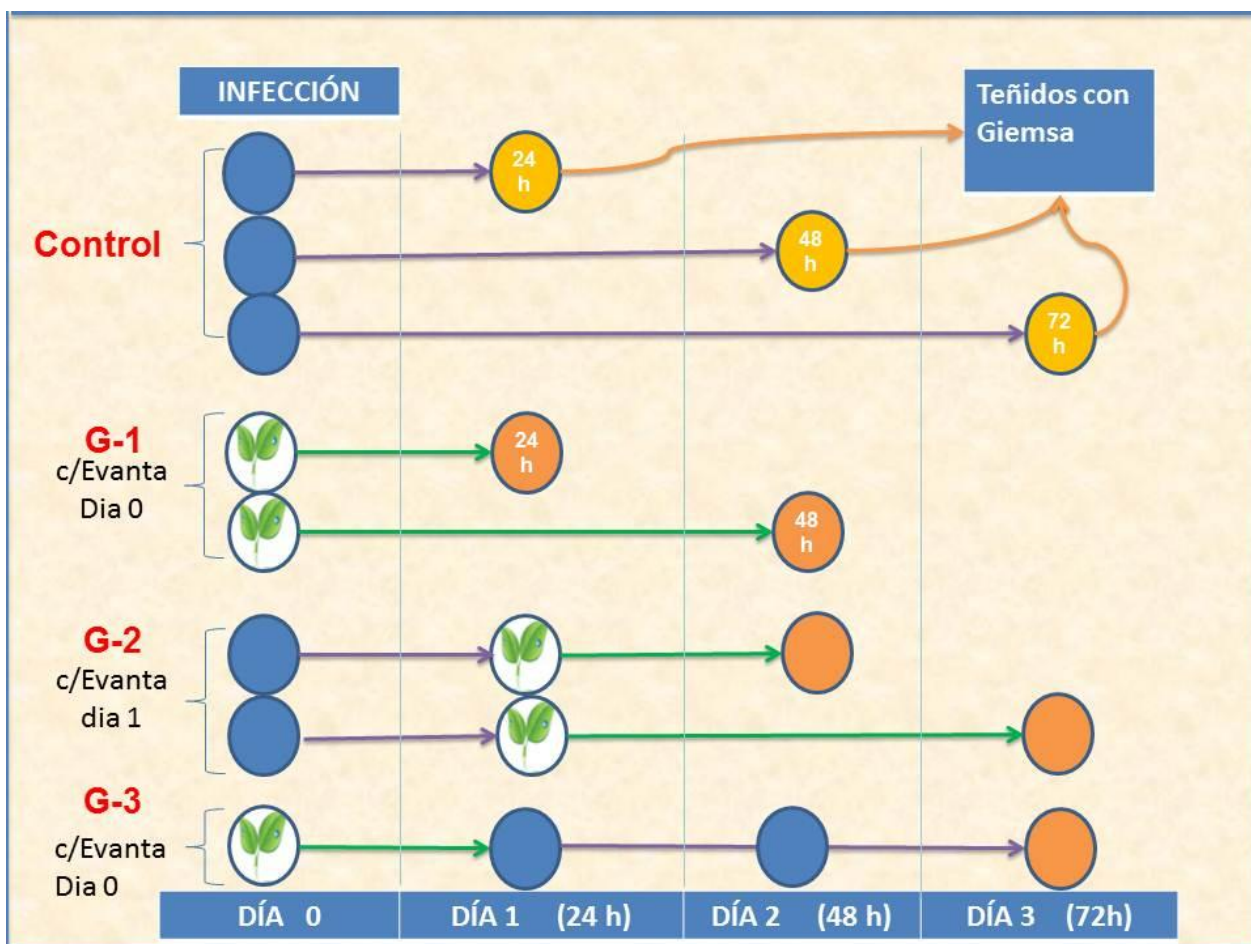
Grupo Control.- Son macrófagos que se infectaron con *L. braziliensis* por 24 horas, se lavaron los parásitos no fagocitados y se mantuvieron en medio DMEN hasta las 72 horas.

Grupo 1.- Son macrófagos que se infectaron con *L. braziliensis* simultáneamente con EAE durante las primeras 24 horas; se lavó el excedente de parásitos y se siguió en cultivo por 24 y 48 horas en medio de cultivo con EAE.

Grupo 2.- Son macrófagos que se infectaron con *L. braziliensis* por 24 horas (día -0); el día-1 se lavó el excedente de parásitos y se añadió medio de cultivo con EAE. Se siguió en cultivo por 24 y 48 horas en medio de cultivo con EAE.

Grupo 3.- Son macrófagos que se infectaron con *L. braziliensis* simultáneamente con EAE durante las primeras 24 horas; se lavó el excedente de parásitos y esta vez se dejó en medio DMEN por 48 horas.

Figura 18. PROCEDIMIENTO DE INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON *L. braziliensis* Y EXPOSICIÓN A EAE



Cumplidos estos tiempos de incubación para cada pozo, se recuperaron los cubreobjetos y se procedió con la tinción.

Los cubreobjetos fueron luego analizados al microscopio y realizamos el recuento de 400 células. Se registro el número de macrófagos que contenían parásitos en su interior y también el número de parásitos por macrófago.

Con los resultados determinamos el porcentaje de fagocitosis y determinamos el número de parásitos por célula (Índice de Fagocitosis)

8. RESULTADOS

Para estudiar el efecto del EAE sobre la capacidad infectiva del parásito se evaluó el porcentaje de macrófagos infectados a las 24, 48 y 72 horas (figura 19)

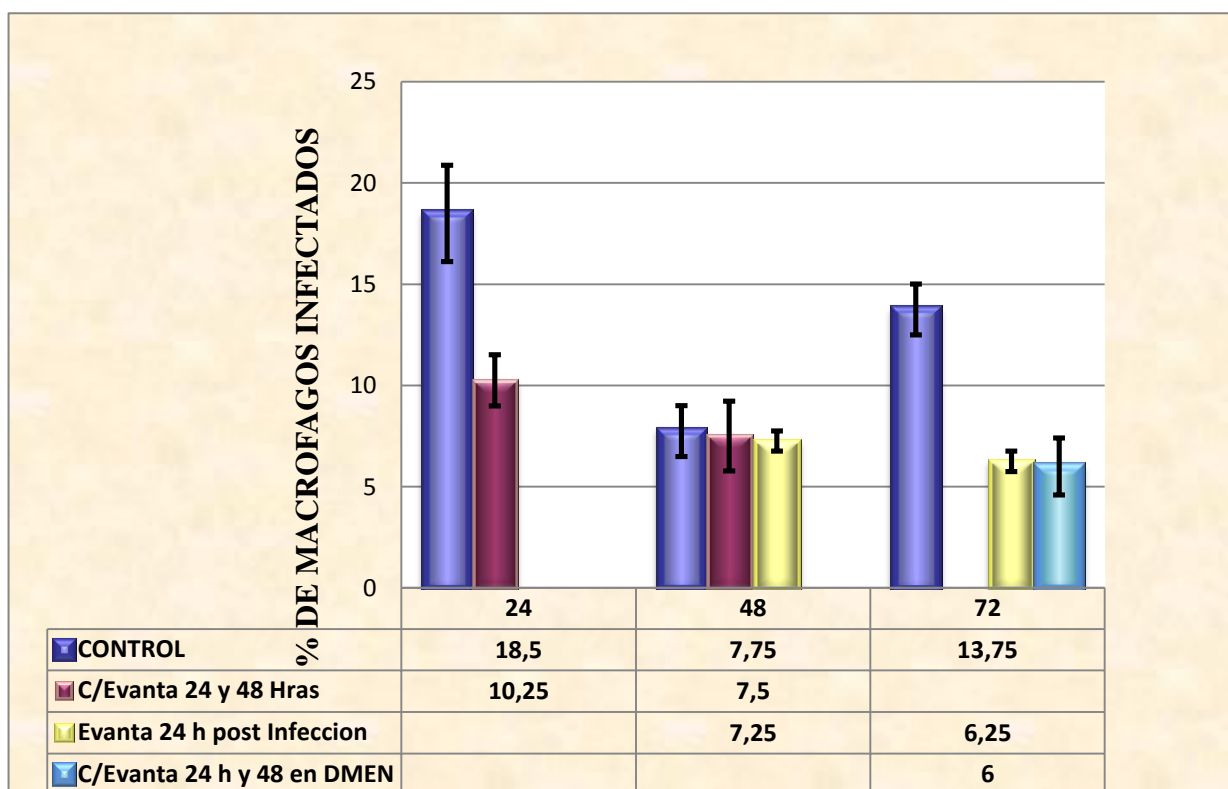
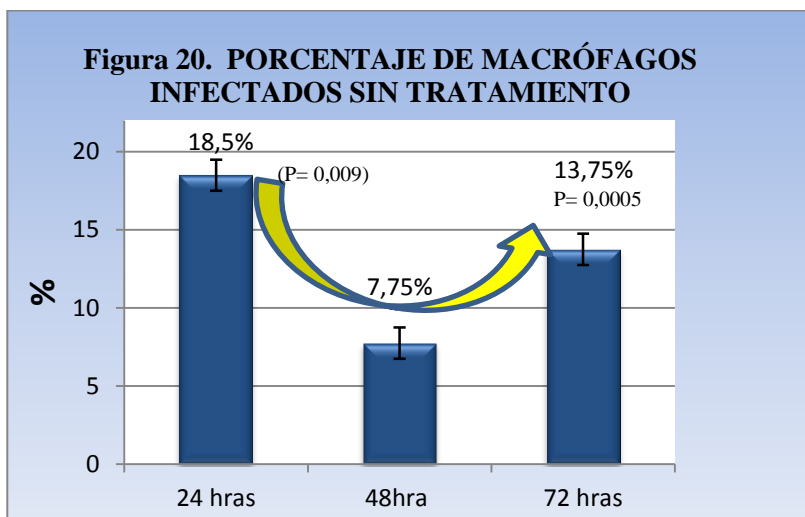


Figura 19. PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *L. braziliensis* TRATADOS CON EVANTA. Macrófagos (M ϕ) fueron infectados con *Leishmania braziliensis* y tratados con EAE en diferentes tiempos. La barra de color azul muestra los M ϕ -control sin tratamiento. La barra roja muestra a los M ϕ tratados con EAE en el día 0. La barra amarilla muestra los M ϕ tratados con EAE pasada 24 horas de infección y la barra celeste muestra el porcentaje de M ϕ tratados con EAE solo 24 horas y mantenidos en cultivo hasta las 72 horas sin tratamiento. (Estos resultados son representativos de tres ensayos independientes)

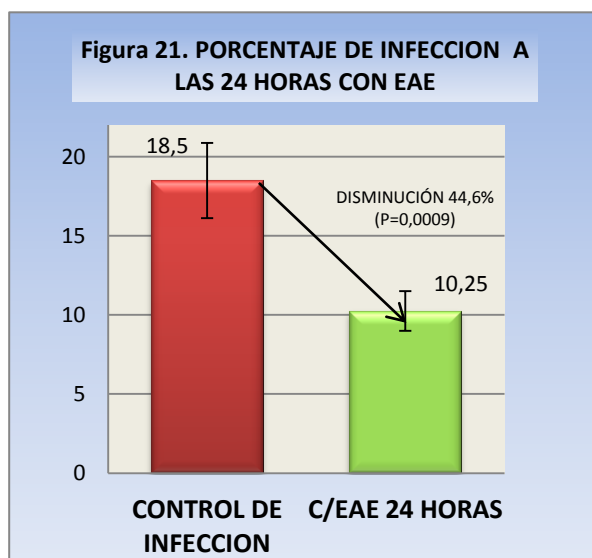
Se observa que:

Los macrófagos que fueron infectados pero no tratados con EAE presentaron un porcentaje de infección de 18,5% a las 24 horas, a las 48 horas los macrófagos produjeron un descenso en el porcentaje de células infectadas a 7,75%, a las 72 horas de incubación el porcentaje de macrófagos infectados aumentó con respecto a las células de 48 horas a 13,75% como se muestra en la figura 20.



En los grupos que fueron tratados con EAE en diferentes tiempos se observa que:

A las 24 horas de cultivo el porcentaje de infectividad disminuye en un 44,6 % (P=0,0009) de 18,5 a 10,25 en los macrófagos que fueron tratados con EAE durante las primeras 24 horas.(Figura 21)

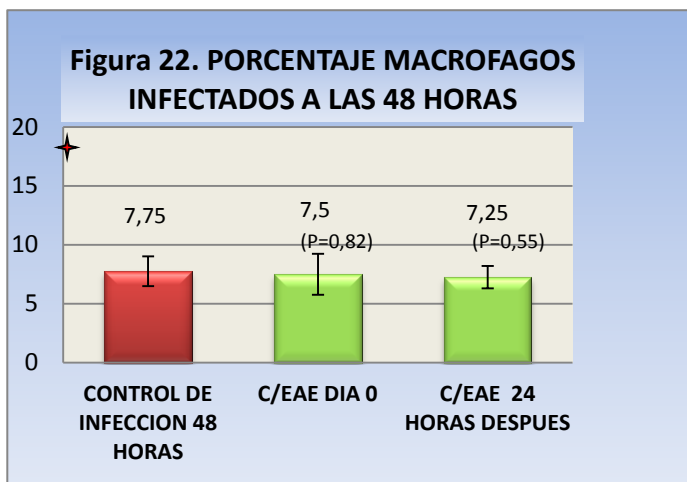


A las 48 horas no existe diferencias en el porcentaje de macrófagos infectados y tratados con EAE comparadas con el control (Figura 22), en este caso se estudio Evanta en el dia-0 y en el dia-1, siendo sus valores de:

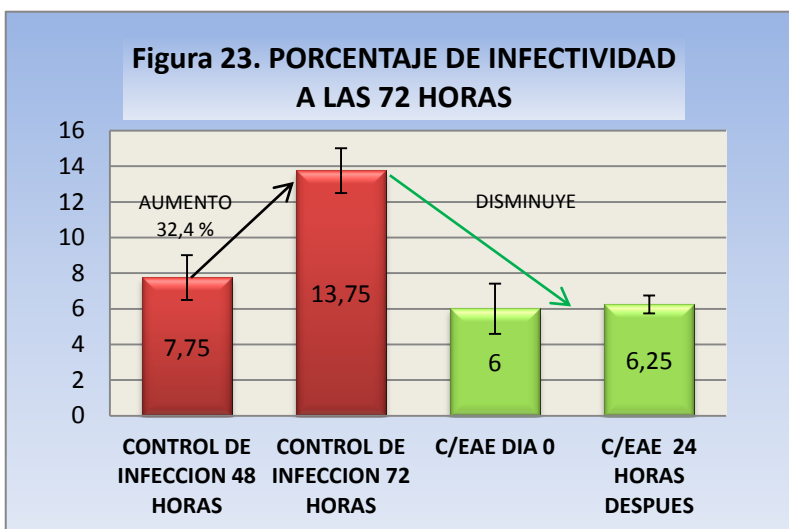
7,75 (control),

7,5 (celulas tratadas con EAE en el dia-0) (P=0,82) y

7,25 (celulas tratadas con EAE post infección dia-1) (P=0,55)



A las 72 horas en las células control surge un incremento en el porcentaje de macrófagos infectados comparados con las células control de 48 h, en un 32,4% (P=0,0005). Comparando los macrófagos control con los macrófagos que fueron tratados con EAE el día-0 y el día-1 que fueron mantenidos en cultivo hasta las 72 horas, encontramos que EAE disminuye la capacidad infectiva del parásito y evita el incremento en el porcentaje de macrófagos infectados manteniéndolo en valores de 6,25% y 6% (Figura 23)



Para estudiar el efecto de EAE sobre la actividad microbicida de los macrófagos se evaluó en primera instancia el porcentaje de macrófagos infectados a las 48 y 72 horas.

Se observó que a las 48 horas no existe diferencia en la capacidad microbicida si en el medio de cultivo se encuentra EAE, comparado con las células control de 48 horas; en las células control se encontró una disminución de 41,9% y las células tratadas con EAE en el día 0 y día 1 disminuyó un 40,5% ($P=0,82$) y 39,1% ($P=0,55$) respectivamente.

A las 72 horas de cultivo los macrófagos tratados con EAE no presentaron cambios en la capacidad microbicida con respecto a los valores encontrados a las 48 horas ($P=0,11$). Sin embargo se encontró una disminución en la capacidad microbicida en macrófagos no tratados con EAE comparados con el grupo que fue tratado al inicio de la infección o 24 horas después, estos últimos presentaron un 6% y 6,25% de macrófagos infectados.

En segunda instancia se evaluó el número de parásitos por macrófago (índice de fagocitosis) a las 48 y 72 horas (Figura 24):

Se observó que no existe diferencia en cuanto al número de parásitos por célula a las 48 horas si las células son tratadas con EAE. Los valores del control son 1,2 células por parásito y en las células tratadas con EAE el día-0 es de 1,3 ($P=0,4$) y el de los macrófagos tratados el día-1 es de 1,1 ($P=0,64$).

A las 72 horas se determinó que el número de parásitos por macrófago aumentó en células que no fueron tratadas con EAE de 1,15 a 2,15 ($P=0,003$), sobrellevando la capacidad microbicida. En cambio el número de parásitos se mantuvo constante en células tratadas con EAE de 1,1 a 1,2 ($P=0,59$).

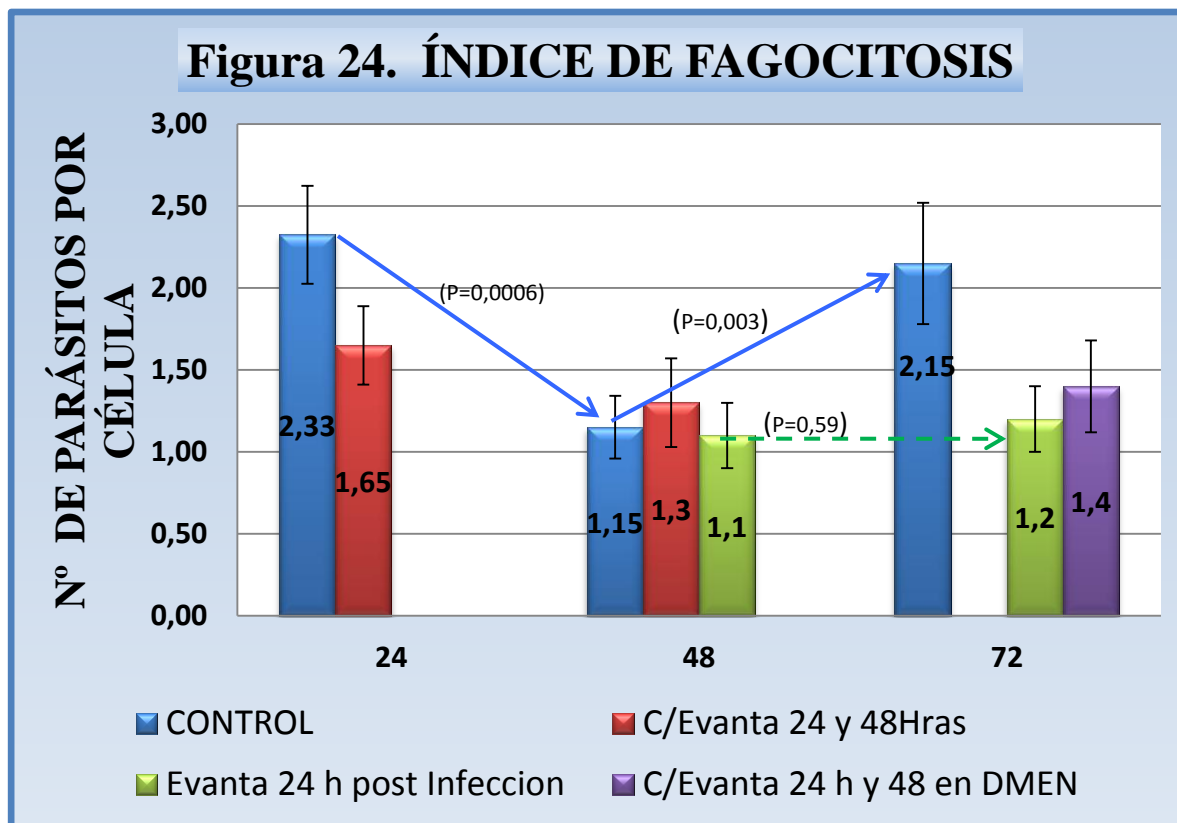


Figura 24. Índice de fagocitosis en macrófagos infectados con *Leishmania braziliensis* y tratados con EAE. La barra color azul corresponde a macrófagos ($M\phi$) que no fueron tratados con EAE, la barra color rojo corresponde a $M\phi$ que fueron tratados con EAE en el día-0 y estudiados durante 48 horas, la barra color verde corresponde a $M\phi$ que fueron tratados con EAE post infección (pasada las 24 horas) y la barra color lila corresponde a $M\phi$ que fueron tratados con EAE el día-0 (24 horas) y mantenidos en cultivo hasta las 72 horas sin tratamiento.

9. DISCUSIÓN

Se ha demostrado ampliamente en estudios anteriores que EAE tiene efecto Leishmanicida. En el presente estudio partimos con la hipótesis de que este efecto pueda también deberse a una acción conjunta sobre el sistema inmune, por esta razón nosotros estudiamos el efecto del EAE sobre la capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis* y el efecto sobre la capacidad microbicida de macrófagos murinos.

Cuando analizamos los resultados mostrados en la figura 20 y 24 de macrófagos no tratados, observamos que tienen la capacidad de fagocitar promastigotes de *Leishmania braziliensis*, permiten la conversión de estado promastigote a amastigote y

se observa una misma cinética en el tiempo, en la cual se inicia a las 24 horas con un porcentaje de 18,5% de macrófagos infectados con 2,3 parásitos/macrófago (índice de fagocitosis), se observa una disminución a las 48 horas en ambos parámetros que se puede atribuir a la actividad microbicida del macrófago, a las 72 horas se observa un incremento tanto en el porcentaje de macrófagos infectados como en el índice de fagocitosis ($P=0,0005$ y $P=0,003$) encontrándose un incremento del 32,4% de macrófagos infectados, cinética del porcentaje de macrófagos infectados e índice de fagocitosis semejante a la encontrada por Pearson y colaboradores ⁽⁵⁴⁾.

En la capacidad infectiva se observo una reducción del 44,6% con una concentración de EAE de 10 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas de incubación hecho que puede atribuirse al efecto directo que EAE tiene sobre el parásito, sugiriendo que a pesar de existir una relación parásito/macrófago 20 a1, el extracto de alcaloides totales de Evanta disminuye la capacidad del parásito de infectar a los macrófagos murinos, aunque el mecanismo de acción de los alcaloides de Evanta es desconocido, esta claramente demostrado que dentro de los metabolitos secundarios vegetales los alcaloides quinolínicos e indólicos de ciertas plantas tienen efecto directo sobre el parásito ⁽⁶⁰⁾.

Cuando analizamos los resultados de los macrófagos tratados con EAE a las 48 horas no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos infectados ni en el índice de fagocitosis comparados con el control; por tanto la capacidad microbicida no se ve aumentada ni disminuida por el tratamiento con EAE.

A las 72 horas en los macrófagos que fueron tratados con EAE el día-0 o en el día 1 (post infección) encontramos los porcentajes de macrófagos e índice de fagocitosis bajos en 6% y 1,2 respectivamente, este hecho indicaría que EAE disminuye la capacidad infectiva de los amastigotes evitando el incremento del 32,4% observado en los macrófagos sin tratamiento y también podría deberse a un control efectivo de los macrófagos tratados con EAE sobre la multiplicación intracelular de los amastigotes.

A las 72 se encontraron resultados interesantes en la capacidad microbicida y en el índice de fagocitosis puesto que los porcentajes de infección e índice de fagocitosis se

mantuvieron bajos en aquellos cultivos en los cuales se puso EAE. Estos resultados muestran que el parásito puede sobrevivir dentro del macrófago y multiplicarse, pero también que los alcaloides totales de Evanta ejercen cierto control de la infección ya sea si se expone al parásito antes de la infección o cuando se encuentra dentro del macrófago, este último fue demostrado en el grupo G-2 estudiado, en el cual Evanta fue administrado 24 horas post infección cuando los parásitos se encontraban en estado amastigote.

Se ha demostrado que EAE disminuye la producción de INF- γ en linfocitos T demostrando así que puede regular la respuesta inmune celular de tal forma de disminuir las consecuencias de los procesos inflamatorios crónicos visto en la Leishmaniasis además de su acción leishmanicida ⁽⁵⁹⁾, y en macrófagos murinos vemos que la acción principal se da disminuyendo la capacidad infectiva del parásito en sus dos formas promastigote y amastigote. Queda por determinar la influencia en cuanto a la secreción de citoquinas y mecanismos moleculares para ver las razones del control en la proliferación de los amastigotes que ejerce EAE.

9. CONCLUSIONES

Evaluamos el efecto del extracto de alcaloides totales de Evanta sobre la capacidad infectiva de *Leishmania braziliensis* y determinamos que Evanta reduce en un 44,6 % la capacidad infectiva en 24 horas con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Determinamos que el EAE disminuye la capacidad infectiva de *Leishmania* en sus dos estados promastigotes y amastigotes.

Evaluamos el efecto del extracto de alcaloides totales de Evanta sobre la capacidad microbicida del macrófago y determinamos que no existen cambios significativos a las 48 horas, sin embargo a las 72 horas determinamos que Evanta mantiene efectiva la capacidad microbicida del macrófago y atenúa los mecanismos de evasión del parásito ya sea si se inicio con Evanta o si se añadió 24 horas después de la infección.

10. RECOMENDACIONES

Creemos que aun hay muchas incógnitas de los efectos de Evanta en el sistema inmunológico, en cuanto a un rol Inmunomodulador , que puedan ejercer los alcaloides presentes en esta planta, por lo que sería importante ver cual su efecto en cuanto a la producción de Citoquinas por parte de los Macrófagos infectados y tratados con el extracto de alcaloides totales de Evanta, y evaluar sus efectos en mecanismos microbicidas específicos de los macrófagos, ya que estas células juegan un rol muy importante en la respuesta inmune y control de la Leishmaniasis.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ministerio de Salud y Deportes. Leishmaniasis-Guía operativa para el control en Bolivia. Documentos Técnicos-Normativos (2007). La Paz – Bolivia.
- 2.- Mollinedo S., Torrez M., Holguin E., Vargas F. Leishmaniasis en Bolivia-epidemiología de fin de siglo. www.galenored.com/trabajos/archivos/129.pdf.
- 3.- Terceros P. Quelca B. Solares M. Plantas Medicinales en Bolivia. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial-Viceministerio de Ciencia y Tecnología (2007). La Paz – Bolivia.
- 4.- Prem Jai Vidaurre de la Riva. Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 2006: 268-284
- 5.- Gimenez A, Avila J. A, Ruiz G., et al. Estudios Químicos, Biológicos y Farmacológicos de Galipea longiflora, KRAUSE. *Rev. Bol. Quim.* 22: 94-107 (2005).
- 6.- Ken Stuart, Reto Brun, Simon Croft et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118:1301–1310 (2008).
- 7.- Organización Mundial de la Salud. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases- First WHO report on neglected tropical diseases (2010).
- 8.- Organización Mundial de la Salud. Control de la *Leishmaniasis*. *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 2010.*
- 9.- Maciel J., Canese A., Adonne R. Manual de Diagnóstico y tratamiento de la Leishmaniasis en Paraguay.
- 10.- Pereira A, Pérez M., Leishmaniosis. *Offarm* vol.21-9; p116-124. (2002)
- 11.- Salomón D., Campanini A., Sinagra A., Luna C. LEISHMANIASIS. *Manual de Laboratorio*, INDIECH. (1996).
- 12.- Nieves E., Rondon M. Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: Interacciones moleculares. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología* 2007; 27: 66-72.
- 13.- Morales M. Epidemiología Molecular de la Coinfección por “Leishmania”-VIH. Tesis. Universidad Complutense de Madrid (2002)
- 14.- Alvarez F., Robello C., and Vignali M.. Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol. Biol. Evol.* 1994; **11**: 790-802.

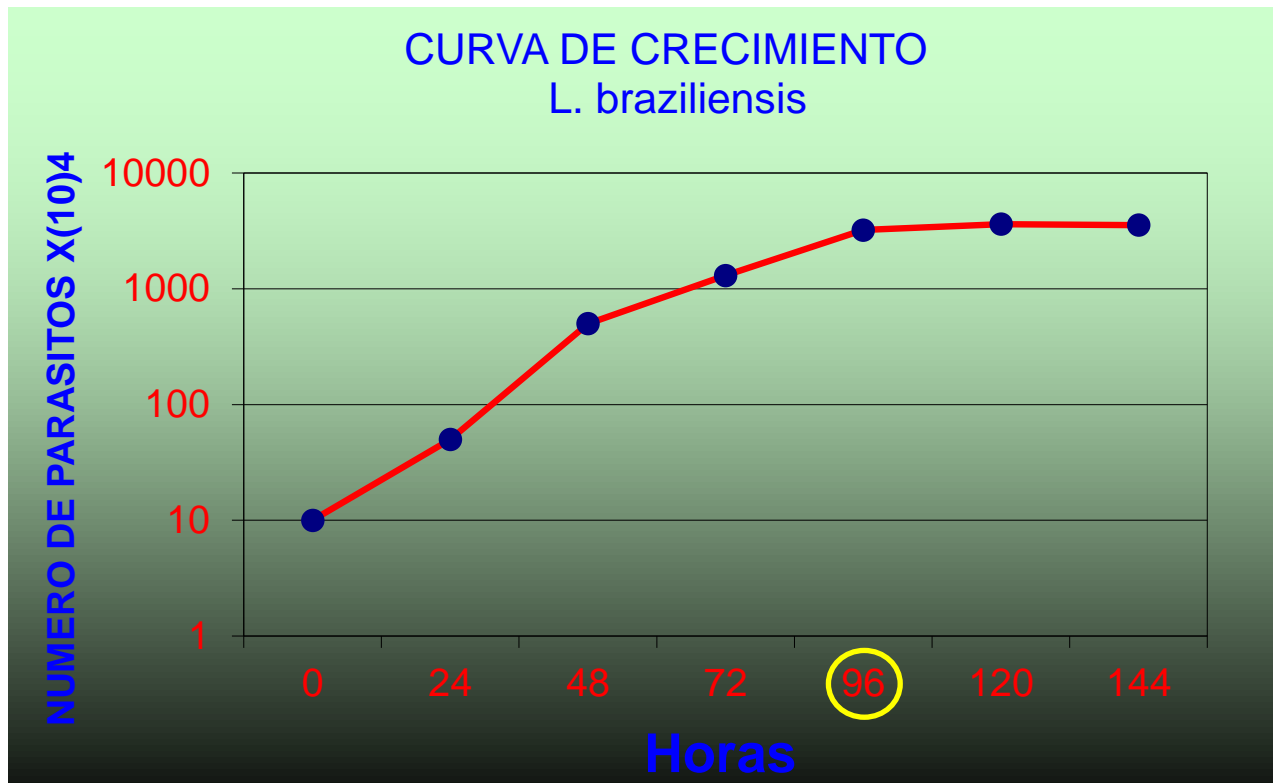
- 15.- Ersfeld K. Genomes and Genome Projects of Protozoan Parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2003; 5: 61-74.
- 16.- Campos J., Gamarro F., Perez J (2008). Caracterización de las proteínas LABCG1 Y LABCG5 de *Leishmania*: implicación en el trafico intracelular del hemo y en la infección de macrófagos. Tesis. Departamento de bioquímica y biología molecular universidad de granada.
- 17.- Chau Huynh, Norma W. Andrews. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cellular Microbiology.* 2008; **10**(2): 293–300.
- 18.- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., and Bouvier, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993; **47**: 821-853.
- 19.- Rivas, L., Kahl, L., Manson, K., and McMahon-Pratt, D. Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; **47**: 235-243.
- 20.- Turco, S.J. and Descoteaux, A.. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 1992; **46**, 65-94.
- 21.- Malcolm J. McConville, Kylie A. Mullin, Steven C. Ilgoutz, et al. Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**; 66 (1):122-154.
- 22.- Bonilla-Escobar D. Respuesta Inmune a la Leishmaniasis: Algo mas que linfocitos T. *Piel.*, 20(8): 383-95.
- 23.- Akira S., Uamatsu S., Takeuchi O., Pathogen Recognition and Innate Immunity. 2006. *Cell*; 124: 783-801.
- 24.- Abul k. Abbas, Andrew Litchman, Shiv Pillai. *Inmunologia celular y Molecular*. 6ta Edición Elsevier- España 2008.
- 25.- Rojas-Espinosa O., Arce-Paredes P. Fagocitosis: Mecanismos y consecuencias. *Bioquímica.* 2004; 29: 55-67
- 26.- Del Pilar S., Robledo S. Respuesta Inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. *IATREIA Revista Medica Universidad de Antioquia.* 2000; 13 (3): 167-178.
- 27.- Hernandez-Riuz J., Beker I., Linfocitos T Citotoxicos CD8+ en la Leishmaniasis cutánea. *Salud pública de Mexico* 2006; 48(5): 430-439.
- 28.- Mukbel R., Patten C., Gibson K. y col. Macrophage Killing of *Leishmania Amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007. 76(4): 669-675.

- 29.- Awasthi A., Kumar R., Saha Bhaskar. Immune response to *Leishmania* Infection. Indian J Med Res. 2004; 119: 238-258.
- 30.- Tripathi P., Singh V., Naik S. Immuneresponse to leishmania: paradox rather than paradigm. Immunol Med Microbiol. 2007; 51: 229–242
- 31.- Rodríguez N. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis. Dermatología Venezolana. 2003; 41 (3): 3-9.
- 32.- Sacks D., Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic Protozoa. Nature Immunology. 2002; 3(11): 1041-1047
- 33.- Cortazar T., Walker J. Manipulación genética y estudio del parásito protozoario *Leishmania*. Biomedica. 2004; 24 (4): 438-455.
- 34.- Ersfeld K. Genomes and Genome Projects of Protozoan Parasites. Curr. Mol. Biol. (2003); 5: 61-74.
- 35.- Sacks D., Kenney R., Kreutzer R, y col. . Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. Lancet. 1995; 345: 959-961.
- 36.- Castaño E. Leishmaniasis. Revista del Hospital del Niño Panamá. 2004; 20 (2): 152-159.
- 37.- Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The Pharmacology of Leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.* 1998; 30: 435-443.
- 38.- Monzote L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. The Open Antimicrobial Agents Journal. 2009; 1: 9-19.
- 39.- Davies C. Reithinger R., Campell-Lendrum D., Feliciangeli D. y col. The epidemiology and control of Leishmaniasis in Andean Countries. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2000; 16(4): 9925-950.
- 40.- Croft S. y Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.* 2002; 8: 319- 342.
- 41.- Ghannoum A. y Rice L. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. Clinical Microbiology Reviews. 1999; 12(4): 501-517.
- 42.- Mittal MK, Rai S., Ashutosh, Ravinder y col. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76: 681-688.

- 43.- Mbongo N., Loiseau P., Billion M., Robert-Gero M. Mechanism of Amphotericin B Resistance in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42(2): 352–357
- 44.- Bray P., Barrett M., Ward S., De Koning H. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*. 2003; 19: 232-239.
- 45.- Perez-victoria J.M., Perez-Victoria F.J., Parodi-Taloci A. y col. Alkyl-lisophospholipid multidrog-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glicoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2468- 2474.
- 46.- Perez-Victoria F.J., Castanys S., Gamarro F. *Leishmania donovani* Resistance to Miltefosina involves a defective inward Translocation of the drug . *Antimicrob agents Chemother*. 2003; 47: 2397-2403.
- 47.- Perez-Victoria F.J., Sanches-Cañete P., Siefert K. y col. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to Miltefosina: Implication for clinical use. *Drug Resistance Updates*. 2006; 9: 26–39.
- 48.- Salamanca E. Actividad Antiparasitaria Múltiple de alcaloides totales de Corteza de *Galipea Longiflora* Krause Kallunki (Evanta). Tesis de post grado. 2008. Universidad Mayor de San Andrés.
- 49.- Fournet A. Hocquemiller R. Roblot A. y col. Les Chimanimines, Nouvelles Quinoléines Substituées en 2 Isolées d'une Plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea Longiflora*. *Journal of Natural Products*. 1993; 56(9): 1547-1552.
- 50.- Fournet A, Ferreira ME, Rojas De Arias A, *et al*. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 2447-2451.
- 51.- Nakayama H, Loiseau PM, Bories C, *et al*. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4950-4956.
- 52.- Blanchette J., Racette N., Faure R, y col. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol*. 1999; 29: 3737–3744.
- 53.- De Almeida M.C., Cardoso S.A., Barral-Netto M. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *International Journal for Parasitology*. 2003; 33: 153–162.

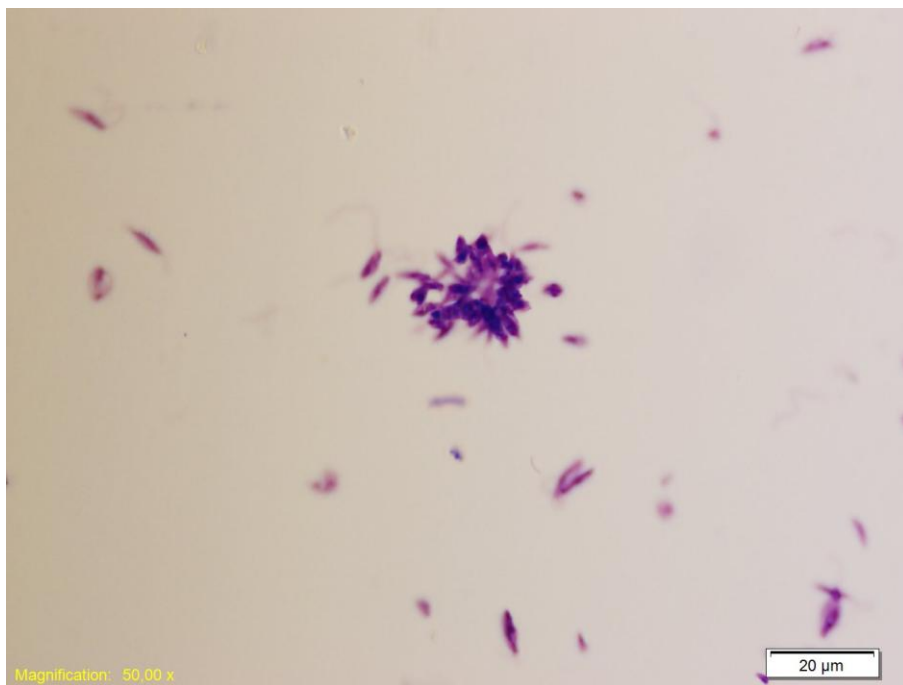
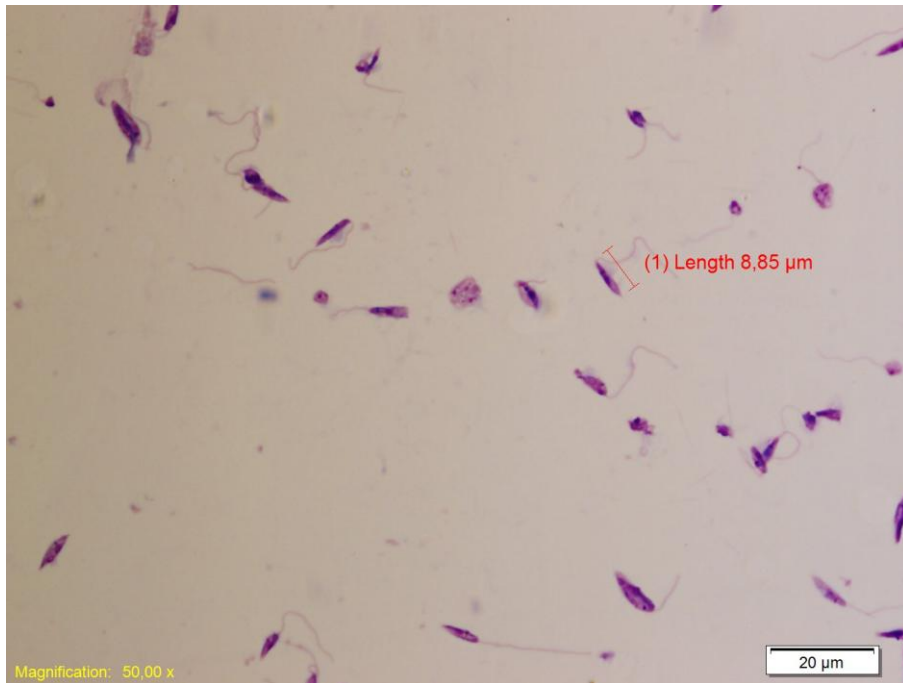
- 54.- Pearson R., Romito R., Symes P., Harcus J. Interaction of *Leishmania donovani* Promastigotes with Human Monocyte-Derived Macrophages: Parasite Entry, Intracellular Survival, and Multiplication. *Infection and Immunity*. 1981; 32(3): 1249-1253.
- 55.- Mukbel R., Patten C., Gibson K. y col. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76(4): 669–675.
- 56.- Copi D., Marcucci M., Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2007; 102(2): 215-220.
- 57.- Ríos Y., Otero A., Muñoz D. y Col. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2008; 37 (2): 200-211.
- 58.- Polonio T., Efferth T. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2008; 22: 277-286.
- 59.- Calla-Magariños J., Gimenes A., Troye-Blomberg M., Fernandez C. An Alkaloid Extract of Evanta, Traditionally Used as Anti-*Leishmania* Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- γ Production in Polyclonally Activated Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008; 69: 251-258.
- 60.- Fuchino H, Kawano M, Mori-Yasumoto K y col. *In Vitro* Leishmanicidal Activity of Benzophenanthridine Alkaloids from *Bocconia pearcei* and Related Compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 2010; 58(8):1047—1050.
- 61.- Chávez Villavicencio Kelly Paola. Optimización del método MTT para proliferación celular, frente a antígenos de *Leishmania* *in vitro*, en pacientes con Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Tesis de post grado 2011. Universidad Mayor de San Andrés.
- 62.- Montes Cordero Fabiola Eliana. Evaluación de la respuesta proliferativa y de producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea durante la gestión 2010. Tesis de Grado 2010. Universidad Mayor de San Andrés.
- 63.- Limache Valderrama Silvana Maria. Detección de la expresión del gen interferón gamma mediante RT-PCR en células murinas tratadas con *Galipea longiflora* (evanta). Tesis de Grado 2011. Universidad Mayor de San Andrés.

ANEXO 1

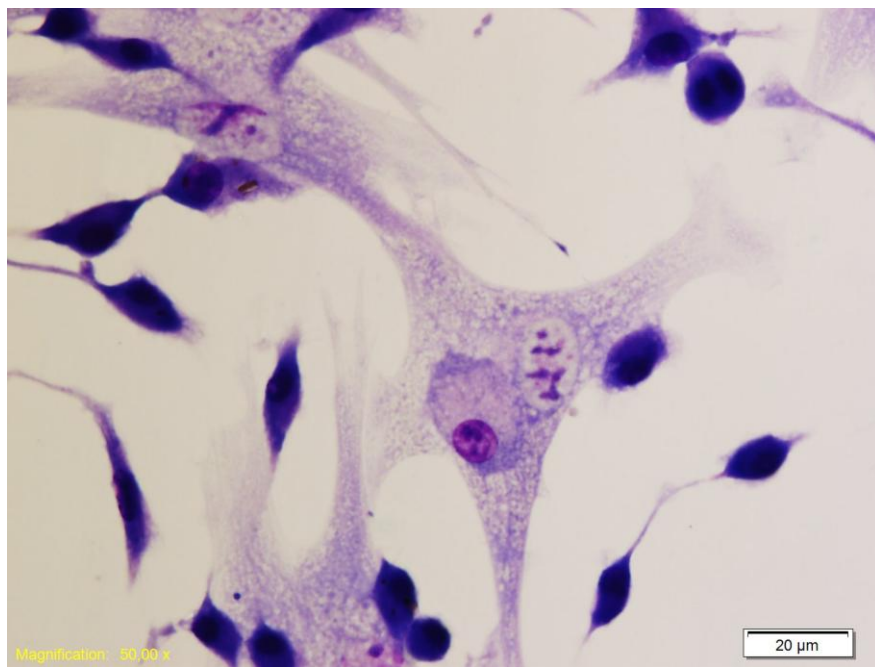
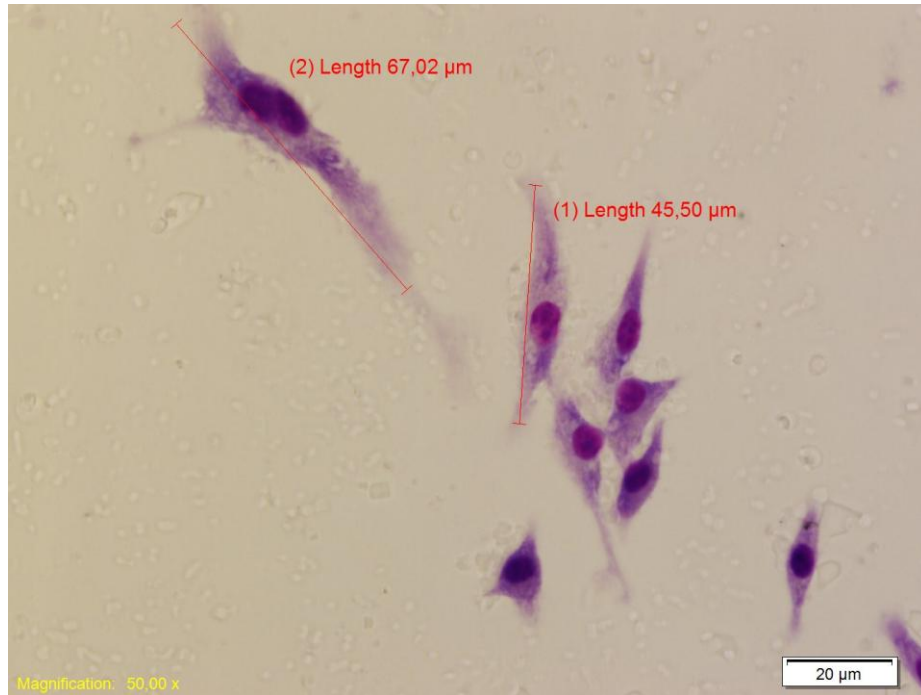


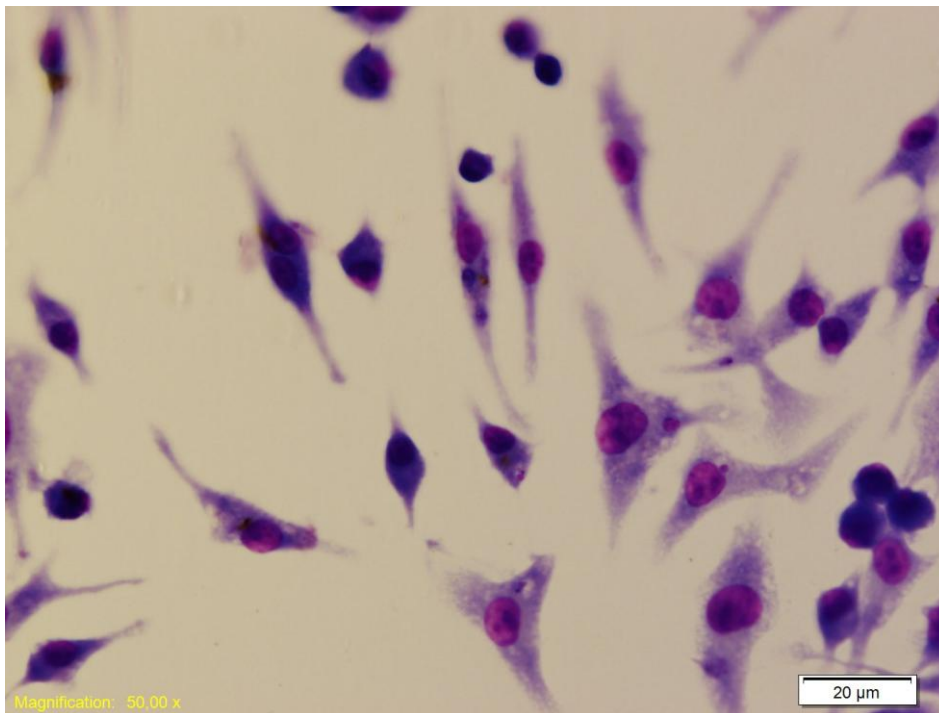
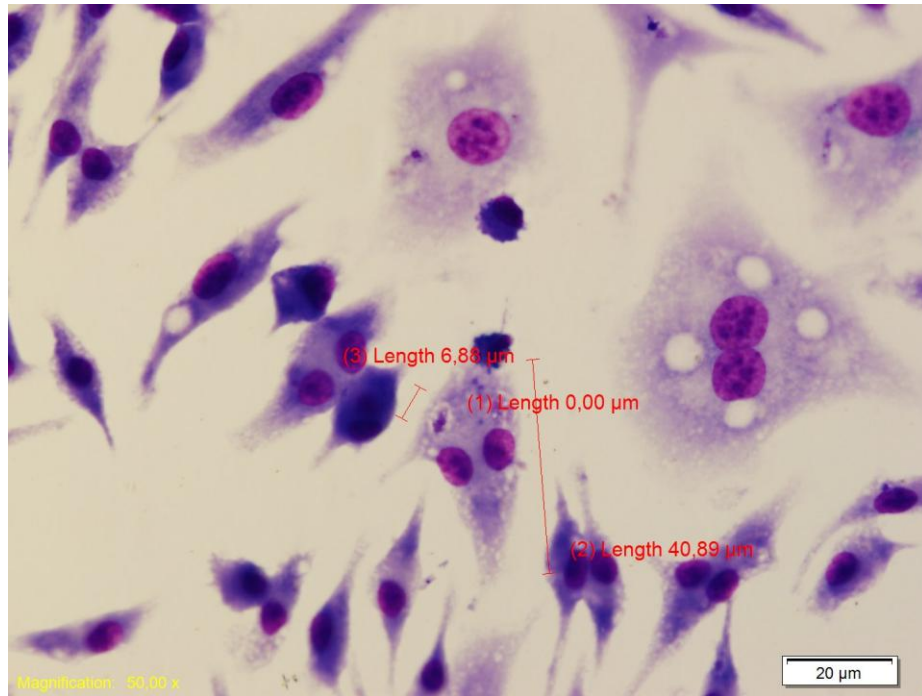
ANEXO 2

CULTIVO DE PARÁSITOS



ANEXO 3 MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS





ANEXO 4
LEISHMANIA EN
MUESTRA DE LESIÓN CUTÁNEA
PALOS BLANCOS

