

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA



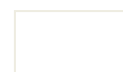
OPTIMIZACION DEL METODO MTT PARA  
PROLIFERACIÓN CELULAR, FRENTE A ANTIGENOS DE  
LEISHMANIA IN VITRO, EN PACIENTES CON  
LEISHMANIASIS CUTANEA Y MUCOCUTANEA

Tesis de grado presentada para la obtención del Grado de Especialidad en Inmunología

**POR: KELLY PAOLA CHAVEZ VILLAVICENCIO**

**TUTOR: Dra. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS M.Sc.**

La Paz - Bolivia  
2011



***DEDICATORIA***

***A DIOS, por la guía que me dio a lo largo del camino, por enseñarme cada día a ser una mujer conforme a su corazón.***

***Bienaventurado el hombre a quien tú corriges y en tu ley lo instruyes.***

## AGRADECIMIENTOS

*A mi mamá, a la que admiro por su fuerza y coraje, por creer en mí y ser mi guía y un apoyo incondicional en mi vida. A mis hermanos, Denis, Jorge y Rocío, a mi abuela Corina y mi tía Sonia por darme aliento para la ardua tarea de caminar hacia la perspectiva de un nuevo día, por su apoyo y su cariño.*

*A mi esposo Darío, por escucharme siempre que lo necesito, por darme ánimos para continuar mi formación y apoyarme en mis decisiones y sobre todo por su amor.*

*A mi tutora, Dra. Jacqueline Calla de Magariños, por su amistad colaboración, entrenamiento, enseñanza constante durante la realización y culminación de este trabajo “Muchas Gracias”.*

*Al instituto Seladis por la beca brindada para el desarrollo de la especialidad y a los docentes que contribuyeron a mi formación. Al laboratorio de inmunología del instituto Seladis por la acogida durante la realización de la tesis.*

*Al Dr. Alberto Giménez y la Dra. Karina Delgado, mis tribunales de tesis, por la revisión, corrección y aportes a este proyecto.*

*A la Dra. Heydi Monasterios del área de Dermatología del Hospital de Clínica, por facilitar el contacto con los pacientes que fueron parte del estudio. Al Dr. Eduardo Chavez director del Hospital de Clínicas y al área de estadística por facilitarme las historias clínicas para sustentar los resultados de este proyecto.*

*A mis compañeros de residencia, Britta, Soraya, Iván, José Luis, Ana y Gina por los buenos momentos que pasamos juntos, por brindarme su amistad tan desinteresadamente y contagiarme su buen humor.*

*Gracias también, en todo sentido a mis líderes Cinthya y Richy, a Maribel, a mis amigos de célula y discipulado por su apoyo y por su grandiosa y verdadera amistad.*

*Por último quiero dar las gracias a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos aquellos que han puesto de su parte para que el trajín diario sea más llevadero.*

## **TABLA DE CONTENIDO**

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| DEDICATORIA.....                                  | i           |
| AGRADECIMIENTOS.....                              | ii          |
| TABLA DE CONTENIDO.....                           | iii         |
| TABLA DE CUADROS.....                             | vi          |
| TABLA DE GRAFICOS.....                            | vii         |
| TABLA DE ABREVIATURAS.....                        | x           |
| RESUMEN.....                                      | xi          |
|   | <b>Pág.</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>                       | <b>1</b>    |
| <b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>        | <b>4</b>    |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>        | <b>7</b>    |
| <b>IV. OBJETIVOS.....</b>                         | <b>9</b>    |
| <b>A. Objetivo General.....</b>                   | <b>9</b>    |
| <b>B. Objetivos Específicos.....</b>              | <b>9</b>    |
| <b>V. DISEÑO TEÓRICO.....</b>                     | <b>11</b>   |
| <b>A. Generalidades.....</b>                      | <b>12</b>   |
| <b>B. Contexto Latinoamericano.....</b>           | <b>13</b>   |
| <b>C. Agente Etiológico.....</b>                  | <b>18</b>   |
| <b>D. Ciclo Biológico de la Leishmania.....</b>   | <b>21</b>   |
| <b>E. El Vector.....</b>                          | <b>26</b>   |
| <b>1. El vector en la zona de los Yungas.....</b> | <b>28</b>   |
| <b>2. El vector en Alto Beni y Amazonia.....</b>  | <b>28</b>   |
| <b>F. Reservorio.....</b>                         | <b>28</b>   |
| <b>G. Transmisión.....</b>                        | <b>29</b>   |
| <b>H. Aspectos Epidemiológicos.....</b>           | <b>29</b>   |
| <b>I. Situación Epidemiológica Boliviana.....</b> | <b>32</b>   |
| <b>J. Fisiopatología.....</b>                     | <b>38</b>   |

|  |           |
|--|-----------|
| 1. La respuesta inflamatoria en la infección por Leishmania                              | <b>40</b> |
| 2. El papel del complemento en los procesos<br>de lisis y fagocitosis de Leishmania..... | <b>41</b> |
| <b>3.</b> La respuesta humoral en infecciones por Leishmania                             | <b>41</b> |
| 4. La inmunidad mediada por células en infecciones<br>por Leishmania.....                | <b>43</b> |
| 5. Papel de las células T CD4+ en infección por Leishmania                               | <b>44</b> |
| 6. Participación de las células CD8+ en la leishmaniasis                                 | <b>50</b> |
| 7. Vías de activación de las células T CD8+ en la<br>leishmaniasis.....                  | <b>52</b> |
| 8. Función efectora de las células T CD8+.....   | <b>54</b> |
| <b>K.</b> Histopatología.....  | <b>55</b> |
| <b>L.</b> Aspectos Clínicos.....   | <b>57</b> |
| <b>M.</b> Diagnóstico de leishmaniasis.....  | <b>72</b> |
| 1. Diagnóstico de laboratorio.....   | <b>73</b> |
| <b>a.</b> Métodos directos o parasitológicos.....  | <b>73</b> |
| <b>b.</b> Investigación de amastigotes.....  | <b>73</b> |
| <b>c.</b> Investigación de promastigotes.....  | <b>74</b> |
| <b>d.</b> Métodos de cultivo .....   | <b>75</b> |
| <b>e.</b> Métodos inmunológicos.....   | <b>76</b> |
| <b>f.</b> Otros.....   | <b>77</b> |
| <b>g.</b> Diagnóstico diferencial .....  | <b>78</b> |
| <b>N.</b> Tratamiento.....   | <b>79</b> |
| <b>1.</b> Leishmaniasis cutánea andina o uta.....  | <b>79</b> |
| <b>2.</b> Leishmaniasis mucocutánea o espundia.....                                      | <b>80</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3. Leishmaniasis visceral.....   | 80        |
| <b>VI. DISEÑO METODOLOGICO.....</b>  | <b>86</b> |
| A. Población en estudio.....   | 86        |
| B. Diseño del estudio.....   | 86        |
| C. Análisis de datos.....  | 86        |
| D. Análisis estadístico .....  | 86        |
| E. Fuente de financiamiento.....   | 86        |
| F. Componente ético.....   | 86        |
| G. Métodos.....  | 87        |
| <b>VII. MATERIALES Y REACTIVOS.....</b>  | <b>88</b> |
| A. Material fungible.....  | 89        |
| B. Reactivos .....   | 89        |
| C. Equipos.....  | 89        |
| <b>VIII. PROCEDIMIENTO.....</b>  | <b>90</b> |
| A. Preparación del medio de crecimiento<br>para <i>Leishmania braziliensis</i> .....   | 91        |
| B. Preparación del extracto crudo (antígenos).....   | 92        |
| C. Cultivo de células mononucleares de sangre<br>periférica frente a Concanavalina A y antígenos totales<br>preparados de <i>Leishmania braziliensis</i> .....                       | 92        |
| D. Evaluación de la proliferación celular de linfocitos<br>utilizando la prueba de MTT, activados con Concanavalina<br>A y Antígenos totales de <i>Leishmania braziliensis</i> ..... | 94        |
| ▪ RESULTADOS.....  | 95        |
| ▪ DISCUSION.....   | 108       |
| ▪ CONCLUSION.....  | 121       |
| ▪ RECOMENDACIONES.....   | 123       |
| ▪ REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....  | 126       |

## **TABLA DE CUADROS**

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Tabla N°1</b> Tasa de morbilidad por leishmaniasis según departamento<br>(Gestión 2000 – 2004).....   | <b>33</b>   |
| <b>Tabla N°2</b> Tasa de morbilidad por leishmaniasis según departamento<br>(Gestión 2005 – 2009).....   | <b>34</b>   |
| <b>Tabla N°3</b> Leishmaniasis confirmados según grupo etáreo y por<br>departamento. (Gestión 2010)..... | <b>34</b>   |

## TABLA DE GRAFICOS

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1</b> Promastigote.....  | 20   |
| <b>Figura 2</b> Ciclo de vida de Leishmania.....   | 22   |
| <b>Figura 3</b> Estadios morfológicos de Leishmania.....   | 25   |
| <b>Figura 4</b> <i>Leishmania</i> sp. Amastigotes en macrófago.....  | 25   |
| <b>Figura 5</b> <i>Leishmania</i> sp. Promastigotes en cultivo.....  | 25   |
| <b>Figura 6</b> <i>Leishmania</i> sp. Promastigote.....  | 26   |
| <b>Figura 7</b> <i>Phlebotomus</i> sp.....   | 27   |
| <b>Figura 8</b> <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....   | 27   |
| <b>Figura 9</b> Incidencia anual de casos de Leishmaniasis, Bolivia,<br>1992-2005.....                         | 33   |
| <b>Figura 10</b> Morbilidad por leishmaniasis: Tasa de incidencia<br>por 100 mil habitantes.....               | 35   |
| <b>Figura 11</b> Mapa de distribución de leishmaniasis, Bolivia.....   | 36   |
| <b>Figura 12</b> Distribución de <i>Leishmania</i> visceral en Bolivia.....                                    | 37   |
| <b>Figura 13</b> Distribución de la leishmaniasis cutánea y<br>mucocutánea en Bolivia.....                     | 37   |
| <b>Figura 14</b> Reacción inmunitaria a <i>Leishmania</i> .....  | 45   |
| <b>Figura 15a</b> Procesamiento de antígenos de leishmania mediante<br>MHC I (Mecanismo directo).....          | 53   |
| <b>Figura 15b</b> Procesamiento de antígenos de <i>Leishmania</i> mediante<br>MHC I (Mecanismo indirecto)..... | 54   |
| <b>Figura 16</b> Infiltrado granulomatoso dérmico intenso de células<br>mononucleares.....                     | 56   |
| <b>Figura 17</b> Leishmaniasis cutánea diseminada.....   | 56   |
| <b>Figura 18</b> Leishmaniasis muco-cutánea.....   | 57   |



|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 19</b> Ulcera característica de Leishmania.....   | <b>59</b>  |
| <b>Figura 20</b> Forma ulcerosa.....  | <b>60</b>  |
| <b>Figura 21</b> Forma verrucosa .....  | <b>61</b>  |
| <b>Figura 22</b> Forma ulcera costrosa.....   | <b>61</b>  |
| <b>Figura 23</b> Forma impetiginoides.....  | <b>61</b>  |
| <b>Figura 24</b> Formas multinodulares .....  | <b>62</b>  |
| <b>Figura 25</b> Forma eczimatoides.....  | <b>62</b>  |
| <b>Figura 26</b> Forma cutánea mucosa.....  | <b>63</b>  |
| <b>Figura 27</b> Forma difusa, 2 años después de iniciada la enfermedad   | <b>68</b>  |
| <b>Figura 28</b> Forma difusa, el mismo paciente 20 años después.....   | <b>68</b>  |
| <b>Figura 29</b> Leishmania visceral.....   | <b>71</b>  |
| <b>Figura 30</b> Leishmania visceral.....   | <b>72</b>  |
| <b>Figura 31</b> Frasco de cultivo.....   | <b>91</b>  |
| <b>Figura 32</b> Cultivo celular de Promastigotes de Leishmania<br>vistos al microscopio.....   | <b>91</b>  |
| <b>Figura 33</b> Policubetas para cultivo celular de 96 pozos.....  | <b>93</b>  |
| <b>Figura 34</b> Paciente N°1, efecto de la Concanavalina A y los antígenos<br>obtenidos por congelación/descongelación y sonicación frente<br>a una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL..... | <b>97</b>  |
| <b>Figura 35</b> Paciente N°2, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....       | <b>98</b>  |
| <b>Figura 36</b> Paciente N°3, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....       | <b>99</b>  |
| <b>Figura 37</b> Paciente N°4, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....       | <b>100</b> |
| <b>Figura 38</b> Paciente N°5, efecto del antígeno obtenido por   |            |

|   |     |
|---|-----|
| congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....  | 101 |
| <b>Figura 39</b> Paciente N°6, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....                                       | 102 |
| <b>Figura 40</b> Paciente N°7, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....                                       | 103 |
| <b>Figura 41</b> Paciente N°8, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....                                       | 104 |
| <b>Figura 42</b> Paciente N°9, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....                                       | 105 |
| <b>Figura 43</b> Paciente N°10, efecto del antígeno obtenido por<br>congelación/descongelación y del antígeno obtenido por<br>sonicación en una población celular de $5 \times 10^6$ células/mL.....                                      | 106 |
| <b>Figura 44</b> Efecto del antígeno obtenido por congelación<br>descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una<br>población celular de $5 \times 10^6$ células/mL en el total de pacientes<br>(Gráfico de dispersión)..... | 107 |

## **TABLA DE ABREVIATURAS**

|        |   |      |   |
|--------|---|------|---|
| AND    | Acido desoxirribonucleico                                 | MCAF | Factor quimiotáctico activador de monocitos             |
| CBBA   | Cochabamba  | MHC  | Complejo mayor de histocompatibilidad                   |
| CD     | Células dendríticas                                       | MIF  | Factor inhibidor de migración                           |
| Con A  | Concanavalina A   | MIP  | Proteínas inflamatorias de migración                    |
| CR     | Receptores del complemento                                | MTT  | (3 - [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazolio) |
| D.O.   | Densidad Óptica   | NK   | Células Natural Killer                                  |
| ECG    | Electrocardiograma  | NO   | Oxido Nítrico   |
| ETV    | Enfermedades transmitidas por vectores                    | OMS  | Organización mundial de la salud                        |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos | OPS  | Organización Panamericana de Salud                      |
| Gp63   | Glicoproteína 63  | ORL  | Otorrinolaringología                                    |
| HAB    | Habitantes  | PBS  | Buffer fosfato salino                                   |
| IFI    | Inmunofluorescencia indirecta                             | PCR  | Reacción en cadena de la polimerasa                     |
| IFN y  | Interferón gamma  | PHA  | Fitohemaglutinina                                       |
| Ig     | Inmunoglobulina   | Ps.  | Psychodopygus   |
| IL     | Interleucina  | RE   | Retículo endoplásmico                                   |
| IV     | Intravenosa   | SDS  | <u>Dodecil sulfato de sodio</u>                         |
| LC     | Leishmaniasis cutánea                                     | SFB  | Suero fetal bovino                                      |
| LCD    | Leishmaniasis cutánea difusa                              | SRH  | Sistema retículo histiocitario                          |
| LCL    | Leishmaniasis cutánea localizada                          | Th   | Linfocitos T helper                                     |
| LCM    | Leishmaniasis cutáneo mucosa                              | TNF  | Factor de Necrosis Tumoral                              |
| LPG    | Lipofosfoglicano  | VO   | Vía oral  |
| LTA    | Leishmania tegumentaria americana                         | VP   | Vacuola parasitófora                                    |
| Lu.    | Lutzomya  |      |   |
| LV     | Leishmaniasis visceral                                    |      |   |

## RESUMEN

### **Optimización del método MTT para proliferación celular, frente a antígenos de leishmania in vitro, en pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea.**

La *Leishmania braziliensis* es un protozooario parasítico causante de la forma más común de Leishmaniasis tegumentaria, denominada Leishmaniasis cutánea. Una fracción de pacientes con Leishmaniasis cutánea desarrolla la enfermedad mucosa o Leishmaniasis cutánea mucosa, en esta forma clínica se caracteriza por una respuesta inmune celular exacerbada, sin embargo los mecanismos asociados a la patología no han sido totalmente esclarecidos.

Para mejorar la comprensión de estos mecanismos, se utilizó un sistema *in vitro* en el cual se extrajeron las células mononucleares periféricas de pacientes con leishmaniasis cutánea y cutánea mucosa internados en el área de Dermatología del Hospital de Clínicas, los linfocitos fueron cultivadas en presencia de antígenos de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

El objetivo general del presente estudio fué evaluar la utilidad de los antígenos de *Leishmania* sobre las células mononucleares del sistema inmune de pacientes con diagnostico de Leishmaniasis, para ello empleamos cultivo celular de *Leishmania braziliensis* y obtuvimos el extracto crudo (antígenos) a través de 2 métodos: congelación/descongelación y sonicación.

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la proliferación *in vitro* de linfocitos de 10 pacientes con diagnostico de Leishmaniasis cutánea y cutánea mucosa, con un régimen de tratamiento al momento de la toma de muestra de sangre, los ensayos se realizaron frente a Concanavalina A (Con A) y antígenos totales de *Leishmania braziliensis*

obtenidos por técnicas de congelación/descongelación y por sonicación, usando el bioensayo de MTT.

En los tres primeros pacientes con LC y LCM, cuyo tiempo de evolución de la infección fue mas de un año, la respuesta de proliferación de linfocitos extraídos, en respuesta a Con A y los antígenos de Leishmania, fue baja en comparación con la respuesta obtenida con los pacientes 4,5,6,8,9,10 que fue más alta, todos los pacientes mostraron una respuesta mayor de proliferación con el antígeno obtenido por congelación/descongelación y solo el paciente N°7 con diagnóstico de leishmaniasis cutánea mucosa y con dos años de evolución de la infección, mostró una respuesta linfoproliferativa más intensa al antígeno obtenido por sonicación.

Por lo tanto los resultados del presente estudio sugieren una respuesta celular específica de los pacientes, cuya manifestación de la respuesta inmune es la proliferación celular, sugiriendo la acción del estado inmunológico del hospedero y el tiempo de tratamiento de la enfermedad.

### **PALABRAS CLAVE**

Leishmaniasis, proliferación celular, antígenos, MTT, Concanavalina A.

## SUMMARY

### **Optimization of the MTT method for cell proliferation, against antigen of *Leishmania in Vitro*, in patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.**

*Leishmania braziliensis* is a parasitic Protozoan that causes of the most common form of Leishmaniasis tegumentaria, called Cutaneous Leishmaniasis. A fraction of patients with Cutaneous Leishmaniasis develops mucosa disease or Leishmaniasis Mucocutaneous thus clinic is characterized by an exacerbated cellular immune response, however, the mechanisms associated with the pathology have not been fully clarified.

Used to improve the understanding of these mechanisms, an in vitro system in which extracted peripheral mononuclear cells of patients with cutaneous leishmaniasis and Mucocutaneous placed in the area of Dermatology of the Hospital de Clínicas, the cells were cultured in the presence of Antigen of *Leishmania promastigotes braziliensis*.

The overall objective of this study was to assess the usefulness of *Leishmania* antigens on mononuclear cells of the immune system of patients with diagnosis *Leishmania*, so use cell culture of *Leishmania braziliensis* and obtained the crude extract (antigens) through 2 methods: freezing/thawing and sonication.

Experiments were carried out to assess the in vitro proliferation of lymphocytes of 10 patients with diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Mucocutaneous and with a treatment regimen at the time of blood sample, the trials were done Concanavalina A (Con A) and total antigen of *Leishmania braziliensis* obtained by techniques of freezing/thawing and sonication using the bioassay of MTT.

Three early patients with LC and LCM, with more than one year evolution of the infection, the response of proliferation of lymphocytes extracted, in response to Con A and Leishmania antigens, was low compared with the response obtained from the patients 4,5,6,8,9,10 was more high all patients showed one response greater proliferation antigen retrieved by freezing/thawing and only # 7 patient with diagnosis of Mucocutaneous leishmaniasis and two years of evolution of the infection, showed a lymph proliferative response more intense antigen retrieved by sonication.

Therefore the results of this study suggest a specific cellular response of patients, whose demonstration of the immune response is cellular proliferation, suggesting the action of the host immune response and disease treatment time.

#### **KEY WORDS**

Leishmaniasis, cellular proliferation, antigen, MTT, Concanavalina A.

## **I. Introducción**

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades causadas por varias especies de parásitos intracelulares obligatorios del género *Leishmania*, la enfermedad depende de la especie que inicia la infección, del estado de salud y la naturaleza genética del individuo infectado.

Principalmente, tres formas clínicas son descritas: Leishmaniasis Cutánea (LC), leishmaniasis cutánea mucosa (LCM) y leishmaniasis visceral (LV). La leishmaniasis cutánea mucosa es causada exclusivamente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* y se caracteriza por involucrar la región nasal, pero puede también afectar la orofaringe, la laringe y la tráquea, causando varias complicaciones que pueden llevar a una severa destrucción del tejido de las vías aéreas <sup>(1)</sup>.

Los agentes etiológicos de la leishmania son transmitidos a los huéspedes vertebrados por la picadura del vector flebotomino, del género *Phlebotomus* (viejo mundo) y del género *Lutzomyia* (nuevo mundo). El vector flebotomino infecta a los mamíferos por inoculación del promastigote dentro de las heridas hemorrágicas creadas en la piel mientras se alimentan de la sangre <sup>(19)</sup>. Los promastigotes son internalizados por células fagocíticas, principalmente macrófagos, y sufren transformación a la forma amastigote dentro la vacuola parasitóforas. Los amastigotes mantienen el parasitismo en el huésped vertebrado por replicación en la vacuola parasitóforas y eventualmente llevan a la destrucción de la célula huésped. <sup>(89)</sup>

Así, la sintomatología clínica resulta de la replicación del parásito dentro de los macrófagos de la dermis, mucosa naso-orofaringe y el sistema fagocítico mononuclear del huésped, e histológicamente las lesiones están caracterizadas por necrosis, placas de nódulos infiltrados en tejido, placas granulomatosas, úlceras en el epitelio septal. Así mismo, el cartílago nasal septal presenta células inflamatorias que parecen estar invadiendo el cartílago, en algunos pacientes se observa intensas reacciones



inflamatorias que pueden aparecer a tempranos días del tratamiento, también se observa infiltración de células del plasma, linfocitos, fibroblastos, macrófagos con amastigotes intracelulares.<sup>(21)</sup>

Estudios extensivos en modelos murinos, han sido realizados para esclarecer la mayoría de los mecanismos inmunogenéticos involucrados en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad; en prueba con *L.major*, la mayoría de las cepas de ratones son resistentes a la enfermedad, desarrollando una respuesta celular CD4 del tipo “T helper 1” (Th1) y este mecanismo es mediado por múltiples citoquinas. Esta respuesta es iniciada por la interleucina (IL-12) y conducida por el IFN- $\gamma$  que estimula al macrófago infectado para controlar la replicación del parásito<sup>(68)</sup>.

Por otra parte ratones BALB/c (cepa de ratones susceptibles prototipo) presentan un desarrollo progresivo de la lesión relacionándose con una exacerbada respuesta celular CD4 Th2 con la producción de citoquinas como IL-4 e IL-5, dando como resultado la muerte. El cambio de una respuesta de tipo Th2 a Th1 parece ser requerido para un fenotipo protector. En humanos una clara diferencia entre producción y resistencia no es observada, aunque hay evidencias indirectas del rol de citoquinas de tipo Th2 en formas de LC, LCM y LV.<sup>(36, 98)</sup>

Contrariamente a *L.major*, pocos trabajos experimentales fueron realizados con *L.braziliensis*, agente causal de LCM, este hecho se debe a que *L.braziliensis* no desarrolla fácilmente *in vitro* y que la conversión del estadio metacíclico, bajo condiciones de cultivo estándar, es ineficiente y se requiere gran cantidad de inóculo parasitario para la infección. Sin embargo, en un estudio reciente, han demostrado que ratones BALB/c infectados con *L.braziliensis* en la dermis de la oreja, desarrolló lesiones ulceradas que cicatrizan espontáneamente, la regresión de la lesión se debe al desarrollo de una respuesta Th1 y este modelo experimental sería útil para el estudio de mecanismos relacionados con inmunidad a la reinfección y persistencia del parásito asociada con LCM.<sup>(116)</sup>

La leishmaniasis cutánea y mucocutánea es una enfermedad de alta prevalencia en muchas áreas tropicales y subtropicales del mundo. En Bolivia se encuentra distribuida geográficamente en el área rural de las zonas tropicales y sub-tropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. En sus diferentes formas está muy difundida entre los 270 m.s.n.m. a 2.400 m.s.n.m. en los valles, yungas, trópico y sub-trópico. <sup>(20)</sup>

Desde 1997 hasta el 2007 se tuvo 2.053 casos en todos los departamentos a excepción de Oruro y Potosí, hasta agosto de 2010, el Ministerio de Salud y Deportes y el Programa Nacional de la Leishmaniasis (PNL) detectó 1.386 casos en todo el país; La Paz, Beni y Pando son los departamentos con mayor índice de casos. De los tres tipos de esta enfermedad los más comunes son: la de tipo cutánea, que ataca a la piel y la de tipo mucosa que destruye los cartílagos y las fosas nasales. <sup>(53)</sup>

La mayoría de los trabajos realizados en Bolivia han estado enfocados a la determinación de las especies de parásitos y la incidencia epidemiológica, principalmente; investigaciones sobre la respuesta inmunológica en pacientes con leishmaniasis, son escasos.

Por ello y con el afán de aportar al mejor conocimiento de la leishmaniasis en nuestro país, el presente trabajo pretende mejorar el entendimiento de los mecanismos de respuesta inmune celular, en linfocitos de pacientes con Leishmaniasis cutánea y cutánea mucosa, en presencia de antígenos de *Leishmania*, además establecer una asociación entre la respuesta celular de proliferación con la forma clínica de la leishmania, en nuestros pacientes en estudio. Se pretende contribuir con la optimización del método MTT para proliferación celular frente a antígenos de *Leishmania braziliensis in vitro*, además de optimizar las técnicas de obtención de antígenos, para aplicarlas al estudio del espectro de respuesta inmune en pacientes con leishmaniasis cutánea y cutánea mucosa.



***PLANTEAMIENTO  
DEL PROBLEMA***

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La complejidad de la inmunidad celular en una enfermedad parasitaria (Leishmaniasis) puede ser evaluada dentro del gran polimorfismo y tomando en cuenta su localización, respuesta inmunológica y extensión, distinguiéndose así, las siguientes formas clínicas: Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis cutáneo mucosa y Leishmaniasis cutánea diseminada.

El curso de la leishmaniasis es complejo e impredecible, depende de una compleja interacción entre el parásito, ya que la misma especie de parásito puede producir diferentes formas clínicas, dependiendo de las interacciones parásito-hospedador, las cuales están genéticamente predeterminadas por genes específicos localizados en determinados cromosomas, muchos de ellos expresados en el complejo mayor de histocompatibilidad, depende también del hospedador, el ambiente e inclusive la especie del insecto transmisor, y la resistencia del hospedero al parásito depende del desarrollo de la respuesta inmune celular.

El mecanismo natural de defensa del organismo, es la activación local de los macrófagos para iniciar la destrucción del parásito; esta activación es mediada por linfocitos TCD4 (Th1), los cuales producen sustancias ayudadoras, tales como INF- $\gamma$ , IL2, Factor estimulador de formación de colonias de neutrófilos y macrófagos y TNF; a lo que se une la cooperación prestada por otras células como los linfocitos TCD8 (citotóxicos), CD3 y las células NK (Natural Killer).

La respuesta no favorable depende de otro "subset" de linfocitos TCD4, los linfocitos CD4 Th2, los cuales producen sustancias supresoras (Interleuquinas 4,5,6 y 10), las cuales además producen una activación policlonal de linfocitos B, con la consiguiente producción de anticuerpos (Gamma globulinas). De tal forma que, en la evolución de la enfermedad tiene vital importancia la relación Th1/Th2.

El patrón de citoquinas determinado en sangre periférica que presentan los pacientes con LCL, es un patrón tipo Th1, lo cual conduce a la curación de las lesiones en estos pacientes, ya sea espontáneamente o luego de una terapia apropiada. Las formas diseminadas de los pacientes con LCD, resistentes a la quimioterapia, se caracterizan por un patrón de citoquinas tipo Th2, con una ausencia total de producción de IL2 e INF- $\gamma$  por parte de los linfocitos específicos para el antígeno. Este tipo de respuesta Th2 probablemente es la responsable de que estos pacientes sean incapaces de controlar la infección, lo cual conduce a la diseminación del parásito por toda la superficie cutánea.

En el área intermedia se encuentran los pacientes con LCM, con lesiones destructivas de las mucosas orales y nasofaríngeas, con tendencia a la cronicidad. Se caracterizan por un patrón de citoquinas mixto tipo Th1 y Th2 que coexisten simultáneamente. Esta situación puede ser la responsable de la no resolución de la enfermedad en estos pacientes, ya que cuando ambos tipos de citoquinas se producen, es posible que las citoquinas tipo Th2 predominen sobre las tipo Th1. La resistencia al parásito está asociada con el desarrollo de la respuesta inmunológica celular específica, la cual es controlada por mecanismos de retroalimentación negativos a través de un estado supresor que se evidencia en una respuesta moderada a los antígenos de Leishmania.

En Bolivia existen escasos estudios inmunológicos de esta enfermedad, una parasitosis endémica que en determinadas zonas del país es causa de alta morbilidad, por lo que nos propusimos estudiar el efecto de los antígenos (extractos crudos del parásito de Leishmania) en la respuesta de inmunidad celular *in vitro* (proliferación de células T) de pacientes voluntarios que presentaban LC y LCM, internados en la sección de Dermatología del Hospital de Clínicas y entender los mecanismos de respuesta inmune celular, implicados en la protección o en la inmunopatología de la enfermedad, además establecer una asociación entre la respuesta celular de proliferación con la forma clínica de la leishmania en nuestros pacientes en estudio, en la fase crónica de la enfermedad.

***JUSTIFICACIÓN***

### III. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Los linfocitos de sangre periférica proliferan cuando se cultivan *in Vitro* en presencia de mitógenos, antígenos y células alogénicas, esta propiedad recibe el nombre de blastogénesis o transformación blástica. En el presente trabajo se estudiará los efectos *in Vitro*, de los antígenos del parásito de Leishmania sobre células del sistema inmune de pacientes con leishmaniasis cutánea y cutánea mucosa, que ya recibieron un esquema de tratamiento al momento de la toma de muestra de sangre. Se observará la respuesta celular de proliferación para cada forma clínica, a través de la optimización de la técnica del MTT para proliferación celular, frente a antígenos de Leishmania *braziliensis in Vitro*. Dicha experimentación también contribuirá con la optimización de las técnicas de obtención de antígenos de Leishmania a partir de cultivos de promastigotes de Leishmania *braziliensis*.

Es importante resaltar que este estudio será útil como punto de comparación con posteriores trabajos, relacionados con preparación de antígenos, estudios de proliferación para cada forma clínica de Leishmaniasis, estudios de parásitos que probablemente se efectuarán con este cultivo, evaluación de la respuesta inmune, con vistas a la implementación de nuevas terapéuticas y su efecto con tratamientos convencionales y naturales.

Consideramos que es necesario continuar los estudios inmunológicos de esta enfermedad, para profundizar en la respuesta proliferativa de los linfocitos al antígeno de Leishmania, los cuales se encuentran relacionados con la defensa del hospedero al parásito y en los mecanismos de evasión del parásito a la respuesta inmune, así como determinar la necesidad de un tratamiento inmunoestimulante u otra terapéutica asociado con el tratamiento habitual de antimoniales pentavalentes en la fase activa y crónica de la enfermedad, que permita favorecer la curación espontánea o un mejor pronóstico de los enfermos.

**OBJETIVOS**



#### **IV. OBJETIVOS**

##### **A. Objetivo principal**

Evaluar la proliferación celular de linfocitos provenientes de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea, a través del método MTT, frente a antígenos de *Leishmania braziliensis in Vitro*.

##### **B. Objetivos específicos**

- Evaluar la prueba de MTT para proliferación celular
- Optimizar técnicas de obtención de antígenos de *Leishmania braziliensis*.
- Determinar las diferencias de la respuesta linfoproliferativa en pacientes con Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis cutánea mucosa.



**DISEÑO  
METODOLÓGICO**

## V. DISEÑO TEORICO

### A. GENERALIDADES

Las Leishmaniasis son 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 de flebótomos o lutzomyias, y el reservorio son animales vertebrados. Estas enfermedades se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de leishmania y la respuesta inmune del huésped. Son enfermedades crónicas de patogenicidad baja y morbilidad relativa<sup>(50-51)</sup>.

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 (cuena del Mediterráneo) y América Central y Sudamérica. Es endémica en 88 países en áreas tropicales, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. Descrita en 24 países de América, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta el norte de Argentina<sup>(51,24)</sup>.

Se estima que la leishmaniasis afecta a 12 millones de personas en el mundo, con 1,5 a 2 millones de nuevos casos cada año<sup>(69)</sup>. Existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección<sup>(92)</sup>. La distribución geográfica de la leishmaniasis está limitada por la distribución del vector. 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>(92)</sup>.

## B. CONTEXTO LATINOAMERICANO

La Leishmaniasis tegumentaria y cutáneo-mucosa es conocida hace mucho tiempo en América Latina. Existen representaciones de la enfermedad en la época precolombina en las cerámicas de Nazca en el Perú, algunas vasijas de esta época representan las lesiones mutilantes de la cara y labios, prueba fehaciente del conocimiento y la existencia de esta enfermedad.<sup>(82)</sup>

La Leishmaniasis cutánea se presenta desde el sur de Estados Unidos hasta el Norte de la Argentina. Canadá, Chile y Uruguay. La mayoría de las islas del Caribe están exentas de la enfermedad. En las Américas existen 13 especies de *Leishmania* que afectan al hombre y que pueden manifestarse en tres formas clínicas diferentes.

Los agentes etiológicos de la Leishmaniasis cutánea simple, incluyen todas las *Leishmania* aisladas del ser humano, incluida la *Leishmania Chagasi*. Los agentes etiológicos de la Leishmaniasis mucocutánea (LMC), también llamada espundia, son la *Leishmania Braziliensis* y *Leishmania Panamensis*, pero en el caso del primero la frecuencia y gravedad es mayor.

En el Brasil la forma cutánea y mucocutánea están muy difundidas, en 24 de los 26 Estados se han registrado casos de Leishmaniasis cutánea. Los agentes etiológicos son: *L. Guyanensis*, *L. Braziliensis* y *L. Amazonensis*, así como algunas nuevas especies, *L. Lainsoni*, *L. Maiffi* y *L. Shawi*. En Colombia se notifican casos de Leishmaniasis cutánea y muco-cutánea, se estima un aumento del número de casos atribuible a actividades de detección y al establecimiento de nuevos asentamientos humanos en zonas enzoóticas, sobre todo en la amazonía, llanuras orientales y la costa del Atlántico. En el valle del río Magdalena y río Cauca, entre 1981 y 1986 se notificaron más de 9.300 casos; en los años 1991 y 1992 se notificaron 10.313 casos con tasa de prevalencia de 13,05 y 17,33 por 100.000 habitantes, respectivamente.<sup>(20)</sup>

En el Ecuador 17 de las 21 provincias presentan Leishmaniasis hasta una altitud de 2.400 m.s.n.m.. Formas muco-cutáneas se han encontrado en la región amazónica. Entre 1983 y 1986 se registraron 4.100 casos, 3.000 casos en 1990. Se han identificado 47 especies de flebótomos, las especies antropofílicas infectadas naturalmente por Leishmaniasis son la Lu. Trapidoi, Lu.Hartmani y Lu. Gomezi.<sup>(20)</sup>

La forma UTA con lesiones en la cara especialmente en niños se presenta en las laderas occidentales de los Andes y valles interandinos entre 900 y 3.000 m.s.n.m. Vectores potenciales son: Lu. Peruensis y Lu. Verrucarum además de la Lu. Ayacuchensis y Lu. Osornoii.

En el Perú la leishmaniasis andina (UTA) y la selvática (ESPUNDIA) son las dos formas que pertenecen al género Viannia. El año 1990 se han notificado 5.500 casos (22% a leishmaniasis andina y 78% a leishmaniasis selvática). La transmisión humana se relaciona directamente con las actividades ocupacionales en el bosque primario, donde existe mucho contacto entre el hombre y el vector, los casos se están incrementando debido a los nuevos asentamientos en tierras bajas.<sup>(53)</sup>

Las Leishmaniasis son un complejo de enfermedades que infectan al humano que vive o tiene actividades laborales en las áreas tropicales y sub. tropicales del planeta; hoy en día se presentan cada vez más expandidas y cobran mayor importancia en la salud pública de los pueblos.

La Leishmaniasis en Bolivia se encuentra distribuida geográficamente en el área rural de las zonas tropicales y sub-tropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. En sus diferentes formas está muy difundida entre los 270 m.s.n.m. a 2.400 m.s.n.m. en los valles, yungas, trópico y sub-trópico. Los nuevos focos activos se hallan ubicados en las tierras tropicales bajas (nuevos asentamientos humanos), donde existe contacto estrecho entre el hombre y el

bosque primario (explotación de la madera), esta migración inclusive ha hecho que la transmisión se vuelva intradomiciliaria. La población boliviana ha estado migrando masivamente a estas zonas, situación que comienza en la década del 80, con el cierre de las minas y la relocalización, se incrementa a principios del 90 con las sequías y en la actualidad por la implementación de proyectos de desarrollo que atraen a la población deseosa de mejorar su condición socio económica. <sup>(55,12)</sup>

A fines del 1998 y principios del 1999 se ha presentado un foco importante de Leishmaniasis en el departamento de Tarija, en Bermejo, localidad fronteriza con la Argentina, donde los investigadores Dr. Sergio Mollinedo y Dr. Alejandro Sánchez Bustamante R. han identificado una nueva cepa que circula (*L. Nevae*), después de la respectiva recolección entomológica y tipificación. Desde la década del 70 a través de investigaciones nacionales y misiones de cooperación de carácter internacional, se efectuaron los primeros estudios e intervenciones sobre esta patología. <sup>(55,12)</sup>

El origen de la enfermedad (Leishmaniasis Tegumentaria) es considerado autóctono del continente americano, situación revelada por las cerámicas antropomorfas (huacos) en la que las culturas pre incaicas (Moche y Chimu, 100 a.c.- 750 d.c.) quienes reflejaron las dolencias de sus enfermos en su alfarería.

Las Leishmaniasis están causadas por más de quince especies y subespecies de parásitos protozoarios flagelados, (10 en el Nuevo mundo), pertenecen al orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae*; estos son morfológicamente semejantes, pudiendo ser distinguidos con métodos moleculares, inmunológicos o bioquímicos; el parásito es dimórfico<sup>(71)</sup>:

- El estado amastigoto es intracelular y se encuentran en los huéspedes vertebrados y ocasionalmente en el humano (piel, hígado, bazo, médula ósea).
- El estado de promastigoto se encuentra en el tubo digestivo de los vectores.

En su ciclo heteroxeno, los reservorios naturales de la enfermedad son mamíferos silvestres principalmente roedores y marsupiales donde la infección tiende a ser benigna e inaparente; los reservorios domésticos, principalmente canideos en el caso de *L. visceral*, presentan una infección virulenta con grandes daños que generalmente les produce la muerte.

Los vectores son del orden Díptera, familia Phlebotomidae, género *Phlebotomus* (viejo mundo) y *Lutzomyia* (nuevo mundo), solamente las hembras al alimentarse de sangre pueden contaminarse de un vertebrado infectado, el parásito cambia de forma en el aparato digestivo del vector y se multiplica enormemente, en otra picadura los parásitos ingresan al eventual hospedador (humano), como promastigotos que ingresan a los monocitos y macrófagos por medio de receptores específicos, transformándose en amastigotos que se multiplican en el sistema retículo histiocitario (SRH).

En nuestro medio los vectores son denominados comúnmente “Champari” en los Yungas <sup>(55)</sup>, Roco Roco en Alto Beni<sup>(55)</sup>, y “Plumilla” en Tarija <sup>(54)</sup>; Viven en lugares húmedos y sombríos y tienen hábitos albo crepusculares; en Bolivia hasta la fecha se han descrito más de 120 especies de flebotomos, de las cuales 38 tienen hábito antropofílico, habiéndose comprobado a 5 especies como vectores de la enfermedad <sup>(38,39)</sup>.

La OMS<sup>(71)</sup> indica que existen 81 países en el mundo que presentan casos autóctonos de Leishmaniasis, con una población en riesgo de 350 millones de personas, existiendo anualmente cerca de 580.000 nuevos casos, con una prevalencia global de 12 millones de personas.

- El 90% de la Leishmaniasis visceral (LV) está en India y Sudán.
- El 90% de la Leishmaniasis cutánea (LC) se encuentra en Afganistán, Arabia Saudita, Argelia, Brasil, Irán, Irak, Siria y Sudán.

Estas cifras son de difícil evaluación, debido a que en las leishmaniasis existen grandes variaciones en corto tiempo, su distribución es focal en zonas alejadas y dispersas; existiendo casos no diagnosticados, casos asintomáticos que no registran los Sistemas de Salud y donde la enfermedad no es de declaración obligatoria.

Bolivia con una población de casi 8.000.000 de habitantes distribuidos en forma irregular en un territorio muy grande, ecológico y geográficamente diverso (1.098.581 Km<sup>2</sup>); no representa estadísticamente con los datos de detección pasiva una población afectada que sea representativa, pero no debe pasarse por alto el hecho que los casos reales pueden estar hasta 40 veces por encima de la detección pasiva <sup>(2)</sup>.

Así mismo, las enfermedades transmitidas por vectores cada año producen mayores problemas de salud, en parte debida a la disminución de las acciones de salud y también debido a la migración de población a zonas tropicales; este proceso esta influenciado por:

- Reducción de pulverizaciones de insecticidas por el programa nacional de control de vectores.
- Múltiples asentamientos (colonizadores) en zonas endémicas de la amazonía, antiguamente no poblada.
- Desarrollo de actividades agrícolas, ganaderas, industriales, auríferas, petroleras, gasíferas, de vinculación caminera, etc.
- Migración de la población debida a sequías, cierre de las minas.
- Calentamiento global y fenómenos climáticos El Niño y la Niña.
- Urbanización rápida y no planificada de nuevos pueblos.
- Modificaciones ecológicas producidas por la población.

En Bolivia a pesar del conocimiento ancestral de la enfermedad, las medidas para encarar la investigación, diagnóstico de laboratorio, tratamiento precoz y completo, eliminación de reservorios domésticos infectados o seropositivos, lucha química contra el vector y educación para la salud, han sido insuficientes; a la fecha encontramos tres



formas clínicas importantes producidas por tres especies de parásitos denominada Kala Azar (del sánscrito: enfermedad negra), fiebre Dum Dum; en Sud América tiene una distribución amplia (México, Guatemala, Honduras, Colombia, Ecuador, Venezuela, Brasil, Bolivia, Paraguay, Argentina); el 90% de los casos se los encuentra en el noreste Brasileño, siendo este país el único foco endémico del continente; en Bolivia y los otros países los focos son esporádicos.

El agente etiológico es la *Leishmania (L) chagasi*, la clasificación actual las incluye en complejos fenotípicos pertenecientes al sub género *Leishmania (L)*, que incluye a los complejos: *mexicana*, *infantum*, *amazonensis*, *enrietti*, *hertigi*; los parásitos crecen fácilmente en los medios de cultivo, se desarrollan en el intestino medio y anterior de la *Lutzomyia*. En el humano parasita los órganos que tienen abundante retículo endotelio (hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos). Varios estudios epidemiológicos realizados sobre el vector del Kala azar, definen al *Lutzomyia longipalpis*, como principal vector en Sur América <sup>(40)</sup>.

### C. AGENTE ETIOLÓGICO

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozooario dimórfico del género *Leishmania*, que pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae<sup>(51,5)</sup> (Véase Anexo N°1). En la actualidad, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los flebótomos vectores: *Leishmania*, en el intestino medio o anterior, y *Viannia*, en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos<sup>(5)</sup>. Morfológicamente las distintas especies de leishmania no se pueden identificar. Para llegar a la clasificación de las especies del género leishmania se debe considerar ciertas características: a) biológicas: morfología, tipo de desarrollo en el flebótomo vector, crecimiento en los medios de cultivo, desarrollo en el hospedador vertebrado; b) bioquímicas: electroforesis de isoenzimas, análisis del ADN del núcleo y del cinetoplasto; c) inmunológicas: reactividad

del parásito con anticuerpos monoclonales y serotipificación del factor de excreción y taxonomía numérica para definir mejor la evolución molecular y la relación filogenética de los parásitos del género *Leishmania*.

Las leishmanias se presentan bajo dos formas diferentes. Una promastigota, son fusiformes, móvil y flagelada, comúnmente encontrada en el vector invertebrado, libre, alargada, miden 10 a 14 por 1,5 a 3,5  $\mu\text{m}$ , poseen un núcleo central, un cinetoplasto terminal o subterminal y un largo flagelo que les permite movilizarse (Figura 3). Estas formas se encuentran en el intestino del insecto vector, se multiplica y migra a la parte anterior del mosquito y está allí hasta ser inoculada (Figura 1).

La otra, amastigota, es inmóvil, intracelular dentro de los macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial del huésped vertebrado, redondeada u ovoide, miden 2,5 a 5,0 por 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  <sup>(17)</sup>, carece de flagelos y de membrana ondulante y, por tanto, es inmóvil. Están provistos de un núcleo central y un cinetoplasto (Figura 3).

En los preparados teñidos con Wright y Giemsa se observa una membrana citoplasmática, que le sirve de sostén y envoltura; un citoplasma azul claro y, ocasionalmente, un cariosoma central o excéntrico. En el citoplasma están incluidos, el núcleo de color rojo púrpura, de localización excéntrica, dirigido un poco hacia la extremidad posterior; el cinetoplasto, que se tiñe intensamente de rojo y que se ubica cerca y delante del núcleo, es una estructura mitocondrial especializada que contiene una cantidad sustancial del ADN extranuclear, contiene el corpúsculo parabasal y un blefaroplasto puntiforme. El axonema o rizonema es un filamento que parte del cinetoplasto y se dirige a la membrana celular.



**Figura 1 : Promastigote**

En Bolivia, para el presente siglo se ha podido certificar que circulan 4 especies parasitarias: *Leishmania (V) braziliensis*; *Leishmania (L) amazonensis*; *Leishmania (L) chagasi* y *L. (V) lainsoni*;<sup>(52)</sup> la primera especie es agente de la Leishmaniasis Cutáneo Mucosa (LCM); la segunda de Leishmania Cutánea (LC) y Leishmania 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.

En América Latina, los subgéneros de *Leishmania* y *Viannia* contienen numerosas especies de las que sólo algunas infectan al hombre.<sup>(47,48)</sup>

### **Subgénero *Leishmania***

- *Leishmania (Leishmania) chagasi* \*
- *L. (L) enrietti*
- *L. (L) mexicana*\*
- *L. (L) pifan*
- *L. (L) hertigi*
- *L. (L) amazonensis*\*
- *L. (L) deanei*
- *L. (L) aristidesi*
- *L. (L) garhami*\*

- L. (L) venezuelensis\*
- L. (L) forattinii

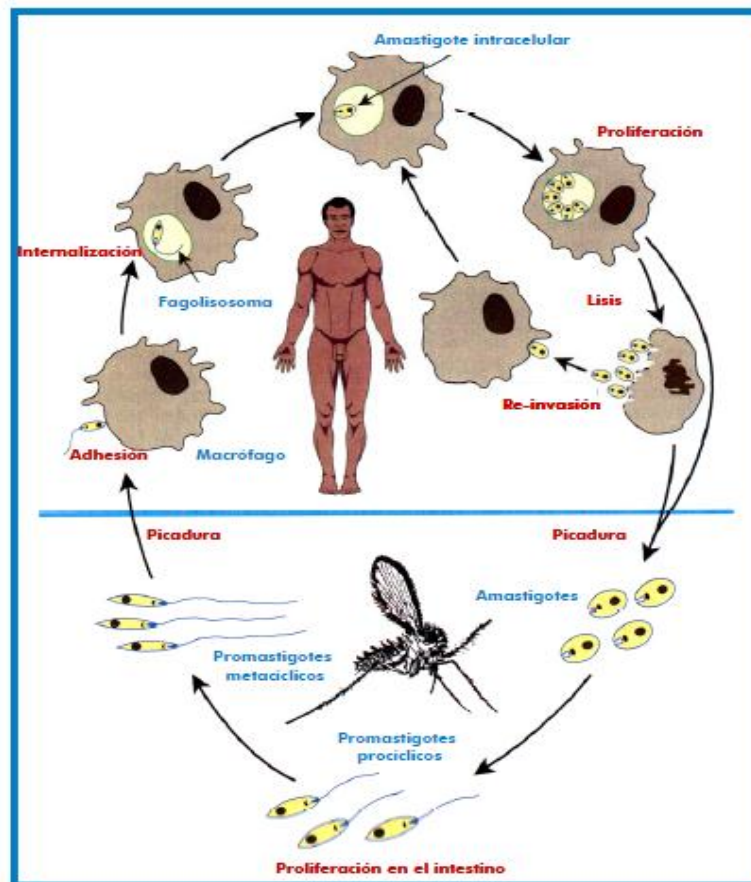
### **Subgénero Viannia**

- Leishmania (Viannia) brasiliensis\*
- L. (V) peruviana\*
- L. (V) guyanensis\*
- L. (V) panamensis\*
- L. (V) lainsoni\*
- L. (V) shawi\*
- L. (V) naiffi\*
- L. (V.) colombiensis
- L. (V.) equatorensis

\* Especies que infectan al hombre. <sup>(51,47,48)</sup>

## **D. CICLO BIOLÓGICO DE LA LEISHMANIA**

Todas las leishmanias presentan un ciclo de vida similar y es importante conocer cada una de las etapas para poder entender y aplicar ciertas medidas de control<sup>(51)</sup>. La leishmania es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos huéspedes. Se pueden producir diferentes ciclos (Figura 2): Uno, principalmente silvestre, en el que la leishmania circula entre los reservorios naturales, y mantiene el ciclo con la participación de los vectores propios de la zona endémica. En un segundo ciclo, los vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peridomésticos. Se puede producir un tercer ciclo, en el que el propio enfermo con leishmaniasis se constituye en reservorio<sup>(51)</sup>.



**Figura 2: Ciclo de vida de Leishmania. Fuente Hadman, 2001**

El ciclo empieza cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado, para alimentarse, e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes dentro de la piel, la transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie de vector y de leishmania. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe.

En el tubo digestivo de la hembra del vector, los promastigotes procíclicos se convierten en promastigotes metacíclicos, son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, mas pequeñas, delgadas, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño que el cuerpo; el núcleo se localiza en el centro de la célula y el cinetoplasto entre el núcleo y la extremidad anterior somática; el rizonema parte del cinetoplasto y se continúa con el flagelo libre<sup>(17)</sup>. Migran hacia la parte anterior del tracto digestivo del vector ubicándose a la altura de la probóscide, listos para ser inoculados en una nueva ingestión de sangre.

Además de los cambios morfológicos, el proceso de metaciclogénesis esta relacionado con la síntesis de moléculas expresadas exclusiva o diferencialmente en el promastigote infectivo. Las moléculas mejor estudiadas, caracterizadas y asociadas con la metaciclogénesis son los lipofosfoglicanos (LPG) y la glicoproteína gp63, expresadas abundantemente en la superficie de los promastigotes, los cuales sufren una notable disminución en el estadio de amastigote.

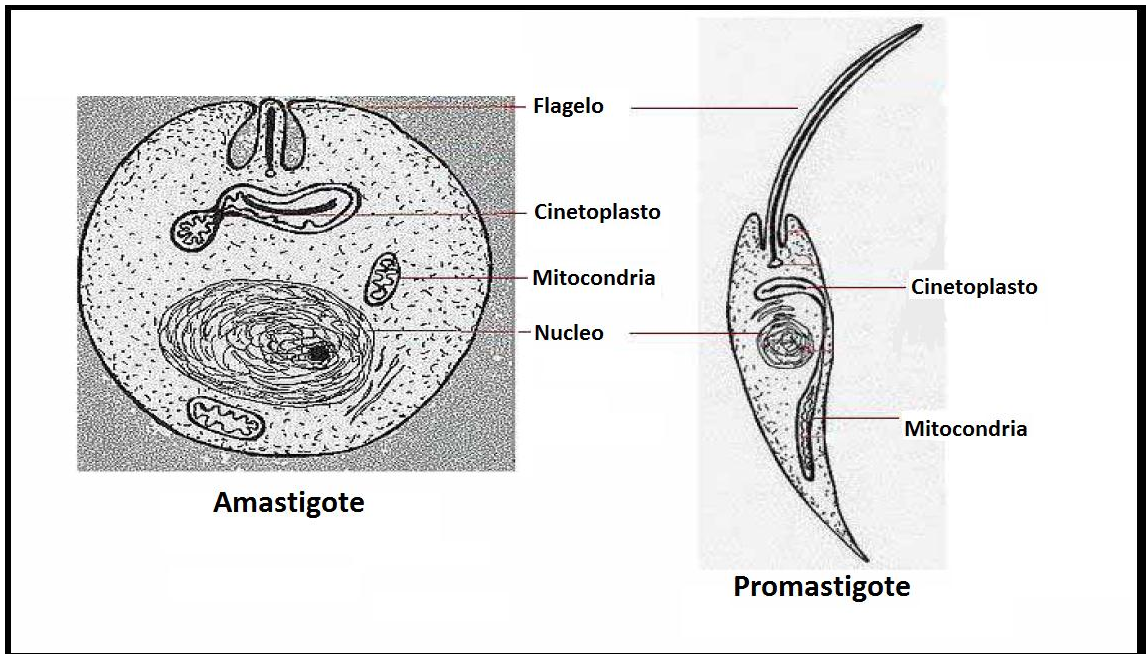
Cuando el vector infectado pica a un huésped, le inocula entre 10 y 100 promastigotes presentes en la probóscide y que penetran en la dermis. La saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados<sup>(17,27,73)</sup>. En los vectores excesivamente infectados, la probóscide está congestionada, lo que hace difícil alimentarse, por lo que el mosquito realiza múltiples picaduras e inoculaciones.

Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial, en un periodo de 3 a 4 horas en promedio<sup>(27)</sup>,

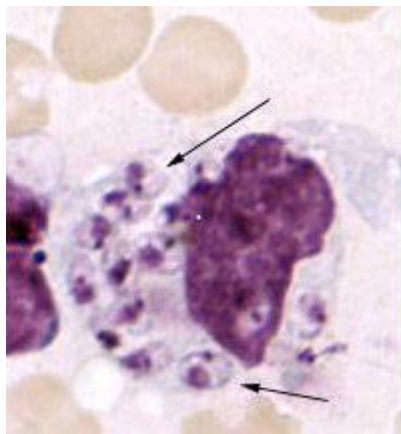
inmediatamente permanecen en estadio estacionario por 36 horas aproximadamente para luego empezar a reproducirse.

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es una etapa fundamental para la invasión de las células del huésped. Sobre la superficie de la *Leishmania* han sido identificados numerosos receptores, entre los más importantes la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos<sup>(88)</sup>. Las especies de *Leishmania* han desarrollado varios mecanismos para resistir la actividad digestiva y antimicrobiana de las células fagocíticas. Los amastigotes son más resistentes que los promastigotes a los mecanismos antimicrobianos inducidos por citoquinas dependientes del oxígeno, lo que refleja una adaptación al crecimiento intracelular.<sup>(28)</sup>

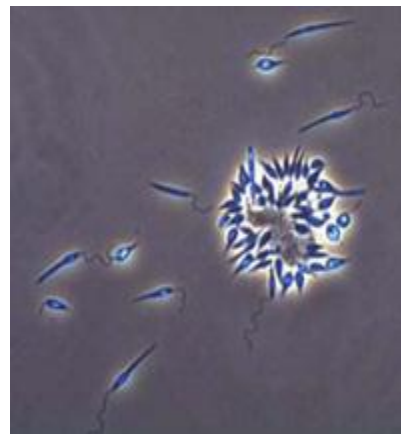
Los amastigotes se multiplican por fisión binaria dentro de vacuolas parasitóforas de los macrófagos. Primero, inician la división del cinetoplasto, uno de los fragmentos conserva el rizonema, mientras que el otro forma su propia estructura flagelar. Luego, sigue la división del núcleo por mitosis y concluye con la del citoplasma, en sentido anteroposterior. La cantidad de amastigotes puede llegar hasta 200, lo que ocasiona la distensión y ruptura del macrófago. Los amastigotes libres entran en nuevas células del sistema fagocitario mononuclear, donde se multiplican de nuevo. El ciclo se reanuda cuando el flebótomo pica a un huésped para alimentarse de sangre<sup>(51,5,73)</sup>.



**Figura 3: Estadios morfológicos de Leishmania.** La forma intracelular llamada amastigote, es pequeña con un núcleo céntrico y ovalado, el cinetoplasto, la mitocondria y remanente del flagelo. La forma promastigote que se encuentra en el vector es mas grande y posee un flagelo que le permite migrar al tubo digestivo del mosquito para infectar a los huéspedes. Fuente Murray et al. 1999.



**Figura 4: Leishmania sp.**  
Amastigotes en macrófago.  
Fuente: CDC/NCID/DPD



**Figura 5: Leishmania sp.**  
Promastigotes en cultivo.  
Fuente: WHO/TDR/Summers





**Figura 6:** *Leishmania sp.* Promastigote.  
Fuente: CDC/ Dr. Mae *Melvin*.

### E. 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>(82)</sup>

En nuestro medio estos insectos son denominados comúnmente “Champari” en los Yungas<sup>(55)</sup>, Roco Roco en Alto Beni<sup>(55)</sup>, y “Plumilla” en Tarija<sup>(54)</sup>. Puede habitar en áreas desérticas, en la floresta y en áreas peridomésticas. Sin embargo, prefiere los lugares húmedos oscuros, en los que existe abundante vegetación. Descansa de día en los rincones, anfractuosidades de las piedras, muros o troncos de los árboles, y vuela al atardecer. Las hembras son las únicas hematófagas y más activas a la caída del día.

La *Lutzomyia* es un mosquito pequeño de 1,5 a 3 mm de tamaño, su cuerpo está cubierto de pelos y tiene las alas erectas en forma de 'V'. Su forma de vuelo es muy particular, a manera de brincos o saltos y mantiene un vuelo bajo y silencioso. El área de su vuelo puede abarcar hasta 200 m. de donde se cría; sin embargo, puede ser

transportado por el viento a distancias mayores. Son, por lo general, de aparición vespertina entre las 18 y 20 horas y desaparecen progresivamente hacia la noche. (Véase Figura 8)



**Figura 7:** *Phlebotomus sp.*  
**Fuente:** CDC/ Frank Collins



**Figura 8:** *Lutzomyia longipalpis.*  
**Fuente:** WHO/TDR/Stammers

A la fecha, más de 112 especies de flebótomos han sido descritas en Bolivia, dentro de estas se ha comprobado a 5 especies como vectores de algún tipo de parásito. En la zona de los Valles Interandinos (Yungas), dos especies de las 17 antropofílicas que se encontraron, tienen un papel vectorial importante: *Lutzomyia longipalpis* (especie dominante en peridomicilio), como vector de *Leishmania (L) chagasi* y *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (especie predominante en los cafetales y foresta residual) en la transmisión de *L.(L) amazonensis* y *L. (V) braziliensis* <sup>(60,90)</sup>. En la zona de la Amazonía (Alto Beni), 3 especies antropofílicas de las 21 repertoriadas han sido incriminadas como vectores: *Lutzomyia carrerai carrerai* (especie más abundante), *Lutzomyia yucumensis* y *Lutzomyia llanosmartinsi*.<sup>(39)</sup>

## 1. EL VECTOR EN LA ZONA DE LOS YUNGAS

*Lutzomyia nunestovari anglesi* es la especie más importante de los flebótomos antropofílicos, (97 % de hembras capturadas con sangre humana), habita en los cafetales y área peri doméstica de los Yungas; siendo agresiva durante todo el año, tiene dos picos anuales: septiembre - octubre y marzo - abril; con hábitos nocturnos, se ha comprobado que ingresa a las viviendas después de las 20 horas y las abandona antes de las 6 de la mañana.<sup>(39,90)</sup>

## 2. EL VECTOR EN ALTO BENI Y AMAZONIA

-*Psychodopygus yucumensis*, descrita en Alto Beni se la encuentra en las últimas cordilleras sub. andinas (Alto Beni y Yapacani), y en las galerías del Beni; es el humano que con su actividad va hacia el vector<sup>(40,39)</sup>

-*Ps. llanosmartinsi*, tiene el mismo comportamiento agresivo antropofílico que *P. yucumensis*<sup>(40,39)</sup>

-*Ps. carrerai carrerai*, es la especie antropofílica predominante en Alto Beni y Pando (cuenca Amazónica)<sup>(39)</sup>, sobre todo en el fin de la estación de lluvias, tiene agresividad diurna, influenciada por factores meteorológicos (lluvia).

## F. 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 las áreas andinas, se ha encontrado infectado naturalmente al perro doméstico (*Canis familiaris*), *Didelphys albiventis* y a una gran variedad de roedores, que incluye a la rata (*Rattus rattus*), entre otros. Se ha encontrado, en algunos estudios, que los

parásitos aislados en el hombre y en la rata pertenecen a la misma especie. En la selva, aún no se ha podido determinar los reservorios.<sup>(50,51)</sup>

En Brasil se ha encontrado como reservorios de la L. (L) amazonensis a los marsupiales y principalmente a los roedores Proechymis y al Oryzomys; de la L. (V) guyanensis, al perezoso (Choloepus didactylus), tamandúa (Tamandúa tetradáctila), marsupiales y roedores; de la L. (V) brasiliensis, a animales domésticos como perros, equinos, mulas y roedores domésticos.<sup>(56,57)</sup>

### **G. TRANSMISIÓN**

Todas las especies de Lutzomyia pueden ser potencialmente vectores de las leishmanias y dependerán de sus preferencias por alimentarse. Las especies que pican al hombre para alimentarse son las que pueden transmitir la enfermedad, mientras que las especies que nunca o solo ocasionalmente pican al hombre pueden ser muy importantes en el mantenimiento de las leishmanias en los reservorios animales. La mayoría de las especies es silvestre y solo ataca a los hombres que penetran en su hábitat. Existen algunas especies que muestran una antropofilia acentuada y se adaptan al domicilio y peridomicilio humano. Las hembras son las responsables de la transmisión de la enfermedad.

### **H. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

La leishmaniasis es una enfermedad de amplia distribución geográfica en el mundo, y abarca zonas áridas, tropicales y subtropicales. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, hasta en un 50%, según la OMS<sup>(79)</sup>. Ocurren alrededor de 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea cada año, de los cuales más del 90% se da en Afganistán, Argelia, Irán, Irak, Arabia Saudita y Siria, y en América, en Brasil y Perú<sup>(29)</sup>. La leishmaniasis cutánea americana es endémica en América Central y América del Sur, con excepción de Chile y Uruguay.

En Bolivia la Leishmaniasis antiguamente era conocida como una enfermedad rural rara, desarrollada en un solo foco “Los Yungas” en el Departamento de La Paz; en la actualidad la proliferación de focos endémicos (Villa Tunari, Ivirgazama, Eterazama, Puerto Villarroel, Chimore, Yapacani, Sapecho, Palos Blancos, Caranavi, Covendo, Bermejo, Madidi, Inicua, Yucumo, Puerto Cavinás, Porvenir, Araras, etc.) han alcanzado grandes áreas de 6 departamentos, situación que nos hace calificar esta enfermedad como Emergente.

En las zonas de antigua colonización (Coroico, Chulumani, Irupana, Ocobaya, Coripata, Cajuata, Ixiamas, San Buenaventura, Tumupasa, Riberalta, Reyes, Guayaramerin, Cobija, Rurrenabaque, etc.), se había mantenido un silencio más o menos importante respecto al número de casos de la enfermedad, sin embargo en la última década el número de reportes han aumentado, los reportes oficiales de casos notificados son patentes de este incremento:

- 120 casos reportados en 1.982.
- 250 casos reportados en 1.988.
- 1.033 casos reportados en 1.992.
- 2.310 casos reportados en 1.996 (Ministerio de Salud).

Sin embargo el sub registro y falta del reporte obligatorio de la enfermedad nos conduciría a multiplicar estas cifras por 4 o 5 <sup>(13)</sup>, para tener los casos estimados más aproximados a la realidad.

La incidencia anual en la población varía de acuerdo a factores climáticos, zona geográfica, tipo de actividad humana, sexo, tiempo de estancia en la selva, etc., y alcanzan de 1,25 a 3,3 % en poblaciones con colonización antigua a 52,6 % en trabajadores de prospección petrolífera; la prevaleticia acumulada de lesiones en todas sus formas es de 16,6 a 29,7%; la población masculina es la más afectada (79 %); con

predominio del grupo de 20 a 30 años (32 %); siendo el 55 % de los pacientes de origen Altiplánico.

Las lesiones primarias (cutáneas) son predominantemente únicas (37 %), habiendo observado hasta 23 lesiones en un solo paciente. La localización de las lesiones primarias difiere de acuerdo a la zona estudiada:

-En los Yungas en una población de ambos sexos, en todos los grupos de edad, la localización de las lesiones es uniforme: cabeza y tronco 29 % , miembros superiores 34 %, miembros inferiores 34 %, situación que apoya el criterio de transmisión nocturna intra domiciliaria.

-En Alto Beni, el sexo más afectado es el masculino en edades económicamente productivas, la localización de las lesiones es predominantemente en miembros inferiores 69 %, miembros superiores 18 % y cabeza y tronco 13 %. Las Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV), son indicadores del bajo nivel de desarrollo socioeconómico de la población y revelan infraestructuras débiles, con políticas, estrategias y programas poco eficaces.

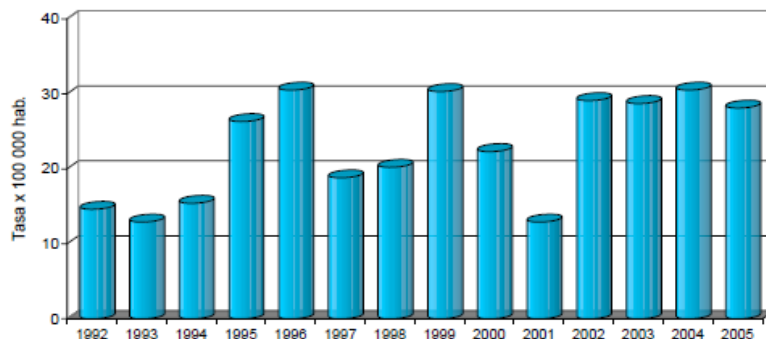
La emergencia de la Leishmaniasis en Bolivia se debería a las condiciones epidemiológicas favorables asociadas con la gran extensión de territorio nacional (70% valles y trópicos), reducción del espacio ecológico natural de la zoonosis, proyectos de desarrollo socio económico que obliga a la migración masiva creando asentamientos densos y dispersos con deficiencias estructurales y sanitarias, con una masa poblacional joven que se transforman en potenciales hospederos no inmunes, poblaciones con hábitos de crianza de animales (perro, aves, caballos, cerdos), que elevan la población de los vectores al proveer alimento sanguíneo en abundancia; otro factor importante a mencionar es la finalización de las fumigaciones para el control del vector.

En lo que respecta a las especies de Leishmanias reportadas en Bolivia, se ha podido documentar el aislamiento y tipificación de cuatro especies de Leishmanias sin embargo nuestras observaciones de campo sobre comportamiento clínico de las lesiones, patogenia, características del frotis, inoculación a animales de laboratorio, respuesta al tratamiento y ausencia de complicaciones mucosas, nos hacen presumir la existencia de por lo menos dos otras especies en el territorio Boliviano. El ciclo de la enfermedad a cambiado en las zonas de antigua colonización “urbanizando” el ciclo de transmisión.

El estudio de los ciclos de los vectores y reservorios constituye un procedimiento complejo que requiere profundos conocimientos de la biología y ecología de los insectos y animales, como de los cambios de vida humana (migraciones) y su relación de estos con su entorno (deforestación, agroindustria, etc.); el avance realizado es importante pero se requieren mayores estudios y medición de variables cualitativas y cuantitativas que describan el impacto de la actividad humana en el ciclo de la leishmaniasis (vectores y reservorios).

## **I. SITUACION EPIDEMIOLOGICA BOLIVIANA**

La Leishmaniasis en Bolivia se encuentra geográficamente distribuida en el área rural de los departamentos de La Paz (zona norte y los yungas), Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. Se observa una tendencia creciente de la incidencia desde al año 1992. Anualmente se notifican alrededor de 1.800 casos en todo el país. En el año 2004 se registró una incidencia de 30 casos por 100.000 habitantes, mientras que en el año siguiente disminuyó a 28 casos x 100 000. En el ultimo decenio se aprecia un incremento de casos de esta enfermedad se debe a los procesos de migración a zonas endémicas donde se producen desmontes de la selva primarios produciendo modificaciones al medio ambiente.

**Fig.9 Incidencia anual de casos de Leishmaniasis, Bolivia, 1992-2005**

Fuente: Programa Leishmaniasis

Las tasas de incidencia muestran un comportamiento diferente a partir de los años 1995 y 1996, manteniéndose estables en 1997 y en el año 1998. En el 2000 existe una disminución en el número de casos por problemas de notificación.

**Tabla N°1 TASA DE MORBILIDAD POR LEISHMANIASIS SEGÚN DEPARTAMENTO (GESTION 2000 – 2004)**

| Dptos   | 2000  |       | 2001  |       | 2002  |       | 2003  |       | 2004  |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  |
| Beni    | 426   | 116,1 | 341   | 91,0  | 378   | 98,7  | 435   | 111,3 | 630   | 157,9 |
| Sucre   | 12    | 2,2   | 9     | 1,6   | 6     | 1,0   | 5     | 0,9   | 8     | 1,4   |
| Cbba    | 152   | 10,2  | 192   | 12,6  | 127   | 8,1   | 200   | 12,5  | 192   | 11,8  |
| La Paz  | 1.019 | 42,2  | 1.144 | 46,5  | 1.379 | 55,1  | 1.326 | 52,1  | 1.355 | 52,4  |
| Oruro   | 0     | 0,0   |       | 0,0   | 1     | 0,2   | 1     | 0,2   | 0     | 0,0   |
| Pando   | 158   | 298,9 | 127   | 229,1 | 125   | 214,9 | 165   | 270,6 | 261   | 408,8 |
| Potosí  | 11    | 1,5   | 20    | 2,7   | 5     | 0,7   | 2     | 0,3   | 36    | 4,7   |
| S. Cruz | 244   | 12,2  | 180   | 8,7   | 231   | 10,7  | 164   | 7,3   | 244   | 10,6  |
| Tarija  | 19    | 4,8   | 30    | 7,3   | 266   | 63,1  | 154   | 35,5  | 93    | 20,8  |
| Total   | 2.041 | 24,2  | 2.043 | 23,7  | 2.518 | 28,5  | 2.452 | 27,2  | 2.819 | 30,6  |

Fuente: SNIS-VE (Tasa x 100.000 HAB.)



**Tabla N°2 TASA DE MORBILIDAD POR LEISHMANIASIS SEGÚN  
DEPARTAMENTO (GESTION 2005 – 2009)**

| Dptos   | 2005  |       | 2006  |       | 2007  |       | 2008  |       | 2009  |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  | CASOS | TASA  |
| Beni    | 570   | 140,1 | 889   | 214,3 | 601   | 142,3 | 662   | 153,9 | 336   | 76,8  |
| Sucre   | 15    | 2,5   | 18    | 2,9   | 7     | 1,1   | 9     | 1,4   | 2     | 0,3   |
| Cbba    | 234   | 14,0  | 186   | 10,9  | 342   | 19,6  | 318   | 17,8  | 350   | 19,2  |
| La Paz  | 1.263 | 48,0  | 1.502 | 56,2  | 1.713 | 63,1  | 1.470 | 53,3  | 1.087 | 38,8  |
| Oruro   | 2     | 0,5   | 27    | 6,2   | 9     | 2,0   | 4     | 0,9   | 1     | 0,2   |
| Pando   | 340   | 509,8 | 416   | 598,2 | 416   | 574,4 | 370   | 491,1 | 359   | 458,8 |
| Potosi  | 4     | 0,5   | 25    | 3,2   | 9     | 1,2   | 4     | 0,5   | 6     | 0,8   |
| S. Cruz | 139   | 5,8   | 59    | 2,4   | 44    | 1,7   | 37    | 1,4   | 291   | 10,8  |
| Tarija  | 90    | 19,6  | 30    | 6,4   | 41    | 8,5   | 33    | 6,6   | 15    | 2,9   |
| Total   | 2.657 | 28,2  | 3.152 | 32,7  | 3.182 | 32,4  | 2.907 | 29,0  | 2.447 | 23,9  |

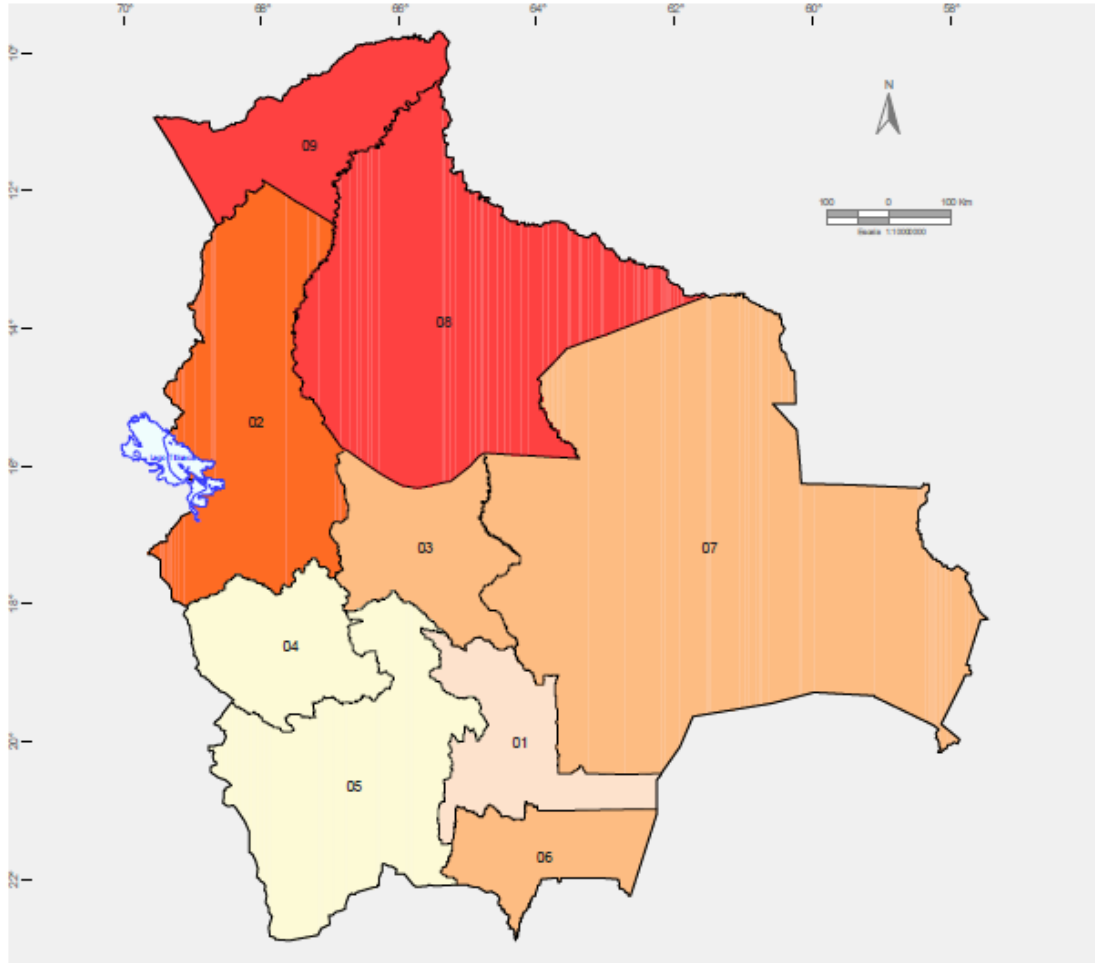
Fuente: SNIS-VE (Tasa x 100.000 HAB.)

**Tabla N°3 Leishmaniasis confirmados según grupo etáreo y por departamento.  
GESTION 2010**

| Deptos     | < de 1 año |    | 1-4 años |    | 5-9 años |    | 10-20 años |     | 21-59 años |     | 60 y más |    | TOTALES  |          |        |
|------------|------------|----|----------|----|----------|----|------------|-----|------------|-----|----------|----|----------|----------|--------|
|            | M          | F  | M        | F  | M        | F  | M          | F   | M          | F   | M        | F  | TOT AL-M | TOT AL-F | TOT AL |
| BENI       | 0          | 0  | 2        | 1  | 4        | 2  | 119        | 43  | 174        | 62  | 15       | 1  | 314      | 109      | 423    |
| CHUQUISACA | 0          | 0  | 0        | 0  | 0        | 0  | 0          | 0   | 1          | 1   | 3        | 0  | 4        | 1        | 5      |
| CBBA       | 1          | 0  | 3        | 3  | 3        | 3  | 31         | 15  | 69         | 37  | 14       | 3  | 121      | 61       | 182    |
| LA PAZ     | 5          | 10 | 31       | 37 | 30       | 43 | 144        | 87  | 220        | 133 | 36       | 9  | 466      | 319      | 785    |
| ORURO      | 0          | 0  | 0        | 2  | 2        | 2  | 4          | 3   | 13         | 10  | 6        | 0  | 25       | 17       | 42     |
| PANDO      | 0          | 2  | 3        | 8  | 8        | 9  | 75         | 25  | 98         | 41  | 15       | 1  | 199      | 86       | 285    |
| POTOSI     | 0          | 0  | 0        | 0  | 1        | 0  | 0          | 0   | 1          | 0   | 0        | 0  | 2        | 0        | 2      |
| SANTA CRUZ | 0          | 2  | 1        | 0  | 0        | 0  | 5          | 1   | 3          | 0   | 1        | 0  | 10       | 3        | 13     |
| TARIJA     | 0          | 0  | 0        | 1  | 0        | 0  | 1          | 0   | 5          | 2   | 2        | 0  | 8        | 3        | 11     |
| Total:     | 6          | 14 | 40       | 52 | 48       | 59 | 379        | 174 | 584        | 286 | 92       | 14 | 1149     | 599      | 1748   |

Fuente: SNIS – 2010

**Fig.10 Morbilidad por leishmaniasis: Tasa de incidencia por 100 mil habitantes**



| CODIGO | DEPARTAMENTO | Tasa leishmaniasis x 100 mil habitantes |
|--------|--------------|---|
| 01     | Chuquisaca   | 2.5                                     |
| 02     | La Paz       | 48.0                                    |
| 03     | Cochabamba   | 14.0                                    |
| 04     | Oruro        | 0.5                                     |
| 05     | Potosí       | 0.5                                     |
| 06     | Tanja        | 19.6                                    |
| 07     | Santa Cruz   | 5.8                                     |
| 08     | Beni         | 140.1                                   |
| 09     | Pando        | 509.8                                   |
| 9      | Bolivia =>   | 28.2                                    |

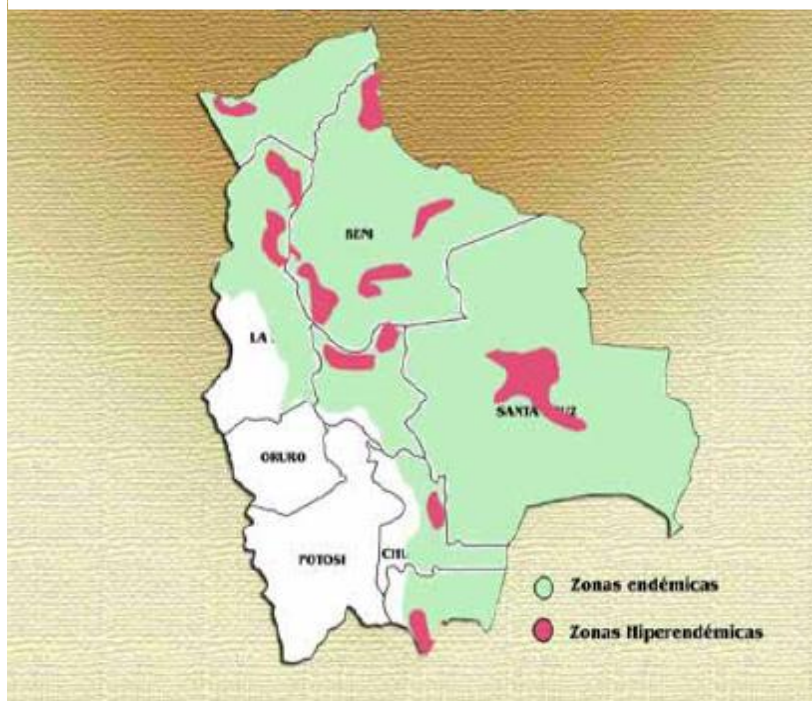
| REFERENCIAS            |    |   |                           |
|------------------------|----|---|---------------------------|
|                        | ID | Tasa leishmaniasis x 100 mil habitantes | Cantidad de departamentos |
| — Limite Nacional      |    | 0.5                                     | 2                         |
|                        |    | 1.0 - 5.6                               | 2                         |
| — Limite Departamental |    | 6.0 - 19.6                              | 2                         |
|                        |    | 48.0                                    | 1                         |
|                        |    | 139.6 - 509.8                           | 2                         |
|                        |    |   | 9                         |

Fuente: SNIS - 2005

La tasa de incidencia más alta en el año 2010, se encuentra en el Departamento de La Paz, que supera los departamentos de Beni y Pando. Las tasas de incidencia en Santa Cruz y Tarija son relativamente menores a la de otros departamentos, aunque por ello no menos preocupantes.

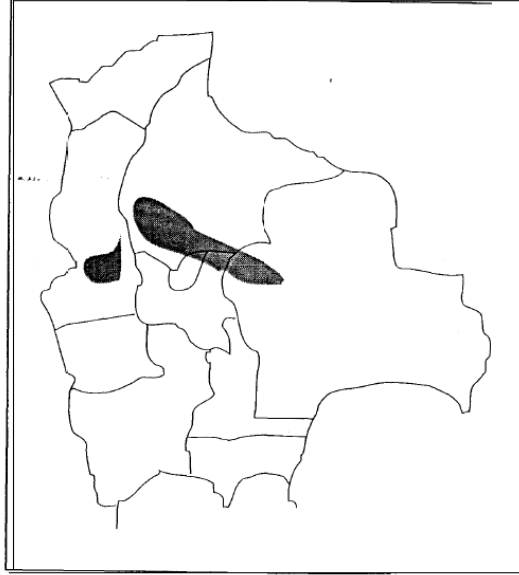
La afección aqueja mayormente a personas en edad productiva, sin embargo preocupa la ocurrencia de casos en menores de 1 a 4 y de 5 a 9 años, esto último sobre todo en el departamento de La Paz. Un 80 % de los pacientes tratados, reciben control laboratorial en el INLASA y en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura. El mapeo de leishmaniasis muestra su distribución tomando en cuenta las categorías de hiperendemicidad y endemicidad de acuerdo a la distribución de los casos. (Véase Fig. 11)<sup>(20)</sup>

**Fig.11 Mapa de distribución de leishmaniasis, Bolivia.**



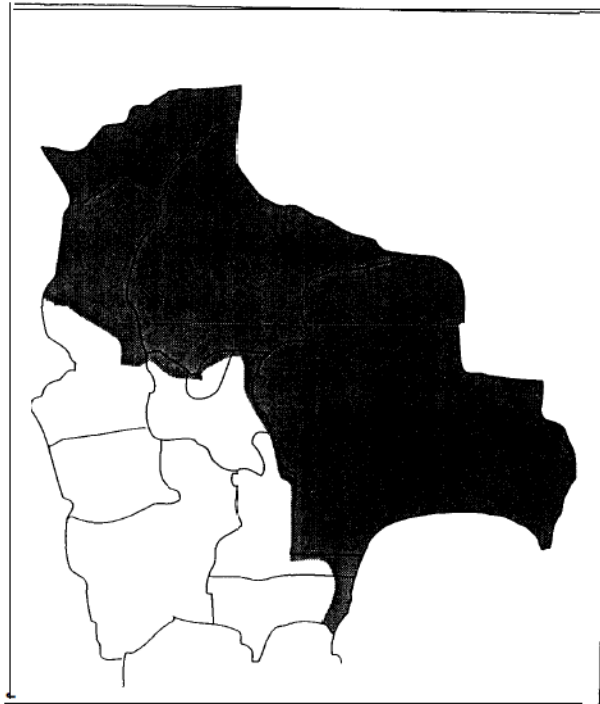
Fuente: Ministerio de Salud y Previsión Social - Dirección General de Epidemiología

**Fig. 12 Distribución de Leishmania visceral en Bolivia**



Fuente: OPS

**Fig.13 Distribución de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Bolivia**



Fuente: OPS

## J. FISIOPATOLOGÍA

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, se genera un espectro de respuestas inmunes que incluyen desde mecanismos de inmunidad inespecífica (por ejemplo: reacciones inflamatorias) hasta mecanismos de inmunidad específica mediados por células o por anticuerpos. Sin embargo, los diferentes mecanismos de respuesta inmune implicados durante la infección por *Leishmania* no siempre aparecen ni se desarrollan simultáneamente.

En términos generales se ha observado una fuerte respuesta mediada por células T para las formas cutánea y mucosa de la enfermedad y ausencia de ella en las formas cutánea difusa y visceral. Al contrario, los títulos de anticuerpos contra antígenos específicos de *Leishmania*, principalmente de tipo IgG, por lo general son bajos en el suero de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucosa mientras que son moderados o altos en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa y visceral.

La producción de IgE específica se asocia con enfermedad cutánea crónica y mucosa y como marcador de enfermedad activa en leishmaniasis visceral, mientras que la producción de IgA se asocia con enfermedad mucosa. Tanto la respuesta inmune mediada por células T como los títulos de anticuerpos son mayores en individuos infectados con *L. (V) braziliensis* que en individuos infectados con *L. (V) panamensis*, independientemente del tiempo de duración de la lesión y la forma clínica de la enfermedad. Sin embargo, los pacientes con lesiones cutáneas crónicas o mucosas presentan mayores índices de respuesta inmune humoral o celular a antígenos de *Leishmania* que los índices de respuesta inmune mostrados por los pacientes con lesiones de corta duración.

Tanto el parásito como el huésped intervienen en el desarrollo de la infección, las leishmanias poseen una serie de estrategias complejas para atacar, infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. El huésped falla para controlar la enfermedad debido a la habilidad que tienen algunas cepas de resistir a la acción microbicida de los macrófagos activados y a la caída de la respuesta inmunoprotectora del huésped<sup>(5)</sup>. En el humano hay fenotipos sensibles y resistentes. Las lesiones que curan espontáneamente están asociadas con una respuesta positiva de las células T antígeno específicas; las formas visceral y cutánea difusa, con una respuesta débil o ausente, y la forma mucocutánea, con una hiperrespuesta de las células T<sup>(23,25)</sup>.

Los promastigotes cuando son inoculados, para escapar de la respuesta inmune inespecífica del huésped, penetran en los macrófagos. Los promastigotes no migran hacia los macrófagos, sino que permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por la vía alterna, e inician la acumulación de neutrófilos y macrófagos.

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es fundamental para la invasión de las células del huésped<sup>(88)</sup>. La proteína sérica C3 del complemento se deposita en la superficie del protozooario y reconoce ciertos receptores de membrana del macrófago. Se han identificado otros receptores sobre la superficie de la leishmania, como la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos<sup>(51,88)</sup>. Una vez que los promastigotes se fijan al macrófago son englobados en una vacuola parasitófora, que se une a los lisosomas y contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir las leishmanias.

Sin embargo, las leishmanias se diferencian y se transforman en amastigotes que resisten a la agresión y se multiplican dentro de estas vacuolas hasta que los macrófagos infectados ya no pueden contener más leishmanias y las células mueren y liberan amastigotes que van a infectar otras células. Las leishmanias destruidas por los macrófagos liberan antígenos que son expresados en la membrana de los macrófagos y presentados a los linfocitos T CD4+ leishmania específicos. La actividad leishmanicida

es debida al aumento de la capacidad de los macrófagos de producir oxígeno tóxico y radicales de nitrógeno en respuesta al IFN- $\gamma$ .<sup>(51,23)</sup>

La fagocitosis de *Leishmania* induce fuertemente la síntesis de NO, incluso si *Leishmania* posee moléculas de superficie que inhiban la producción de NO, posiblemente a través de distintos receptores celulares. Además, la infección con *Leishmania* induce la liberación de citoquinas que inhiben la muerte mediada por NO como el TNF- $\beta$  o la IL-10. La saliva del mosquito, a través del péptido maxadilán, suprime la actividad leishmanicida del macrófago inhibiendo la producción de óxido nítrico y acelerando el desarrollo de la lesión.

### **1. La respuesta inflamatoria en la infección por *Leishmania***

El trauma ocasionado por la picadura del vector induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que involucra la migración de diferentes células, principalmente macrófagos y linfocitos, hacia el sitio del trauma con el fin de reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización. Los dos tipos de células presentadoras de antígeno localizadas en la epidermis, las células de Langerhans y los queratinocitos, participan en el proceso inflamatorio al expresar moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II y moléculas de adhesión que son necesarias para la migración y retención de las células inflamatorias.

En el sitio de la infección, los macrófagos tisulares activados secretan abundantes citoquinas mediadoras de inflamación, incluyendo el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), las interleuquinas (ILs) IL-1, IL-6 e IL-12, al igual que proteínas C3 del complemento. El TNF $\alpha$  y la IL-1 actúan como pirógenos endógenos y activan el endotelio vascular permitiendo la extravasación de leucocitos a través de la unidad perivascular dérmica y la subsecuente migración de estas células hacia el endotelio. La IL-6 participa en la respuesta de fase aguda y en el desarrollo de una respuesta inmune específica mediada por células B, mientras que la IL-12 constituye un potente activador

de células asesinas naturales y estimula la diferenciación de las células T ayudadoras a células Th1.<sup>(99)</sup>

## **2. El papel del complemento en los procesos de lisis y fagocitosis de Leishmania**

Una gran proporción de los promastigotes inoculados por el vector es destruida por el complemento extracelular con lo que se reduce la probabilidad de establecer una infección inicial. Así mismo, el complemento extracelular lisa los amastigotes liberados por macrófagos infectados y en esta forma se limita la invasión de nuevas células vecinas y se evita la perpetuación de la infección y el desarrollo de enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado que los promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L.(V.) braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento y los promastigotes de varias especies resisten a la lisis por complemento.

Por otro lado, los amastigotes de las diferentes especies de *Leishmania* fijan en su membrana proteínas del complemento tales como C3b, favoreciendo así la entrada del parásito a la célula hospedera a través de los receptores para complemento (CR1 y CR3) presentes en la membrana de dichas células. Al mismo tiempo, la entrada del parásito a través de los receptores CR favorece su supervivencia dentro del macrófago, ya que la ocupación de estos receptores no induce una respuesta oxidativa en los macrófagos. Es así como *Leishmania* no sólo evita la activación del complejo lítico del complemento sino que utiliza la proteína C3 para invadir en forma silenciosa al macrófago.<sup>(99)</sup>

## **3. La respuesta humoral en infecciones por Leishmania**

Aunque algunos antígenos de *Leishmania*, principalmente del tipo gp63, LPG y KMP-11 inducen la producción de anticuerpos específicos, principalmente de tipo IgM e IgG; las evidencias clínicas excluyen un papel protector para el humano. Los pacientes con cualquier forma clínica de leishmaniosis desarrollan una respuesta de anticuerpos desde



una etapa temprana de la infección, que se mantiene durante el curso de la enfermedad y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría de los parásitos. Se ha observado que la producción de anticuerpos varía dependiendo de la forma clínica de la enfermedad, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección.

In vitro, dichos anticuerpos tienen la capacidad de lisar promastigotes en presencia de proteínas del complemento, favorecer la fagocitosis de parásitos opsonizados por los mismos anticuerpos. Las formas cutánea y mucosa, que son infecciones intracelulares crónicas pueden producir, en la fase temprana de la enfermedad, una importante respuesta de inmunoglobulinas de tipo IgM y luego desarrollar una respuesta predominante de tipo IgG. Los niveles de anticuerpos específicos de tipo IgA e IgE son bajos.<sup>(99)</sup>

En la leishmaniosis visceral, la gran cantidad de parásitos presentes en el hígado y en el bazo, dos órganos muy importantes en la iniciación y maduración de la respuesta de anticuerpos, inducen la aparición de una respuesta policlonal. La producción de anticuerpos es muy alta en esta forma clínica de leishmaniosis, lo que da un incremento de inmunoglobulinas inespecíficas, incluyendo autoanticuerpos, aunque también se han detectado altos títulos de anticuerpos específicos. En términos generales hay una fuerte respuesta humoral en la leishmaniosis visceral y cutánea difusa, con altos títulos de anticuerpos principalmente de la clase Ig G, mientras que las leishmaniosis cutánea y mucosa cursan con bajos títulos de anticuerpos.

Recientemente se ha demostrado una gran diferencia entre las subclases de anticuerpos específicos de *Leishmania* en las distintas formas clínicas de la leishmaniosis. Es así como en la leishmaniosis cutánea predominan las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgG3, en la leishmaniosis mucosa la subclase IgG3, en la leishmaniosis cutánea difusa la subclase IgG4 y en la leishmaniosis visceral los anticuerpos predominantes son IgG1. Esta producción selectiva de subclases de anticuerpos parece estar relacionada con las citoquinas secretadas por cada tipo de células. Existen evidencias sobre la relación entre

la respuesta Th1 o Th2 y los isotipos y las subclases predominantes de las inmunoglobulinas específicas: las Th1 son inductoras de la producción de IgG2a, mientras que las Th2 inducen la producción de IgE y IgG1.<sup>(99)</sup>

La respuesta humoral tiene un efecto negativo en la leishmaniosis y la proliferación de linfocitos B, causantes del exceso de producción de anticuerpos, da lugar a la formación de inmunocomplejos circulantes que originan patologías como la vasculitis, poliartritis y glomerulonefritis. El exceso de autoanticuerpos circulantes da lugar a anemia y trombocitopenia y los anticuerpos circulantes facilitan la fagocitosis de los amastigotes por los macrófagos, lo que es esencial para su multiplicación.

#### **4. La inmunidad mediada por células en infecciones por Leishmania**

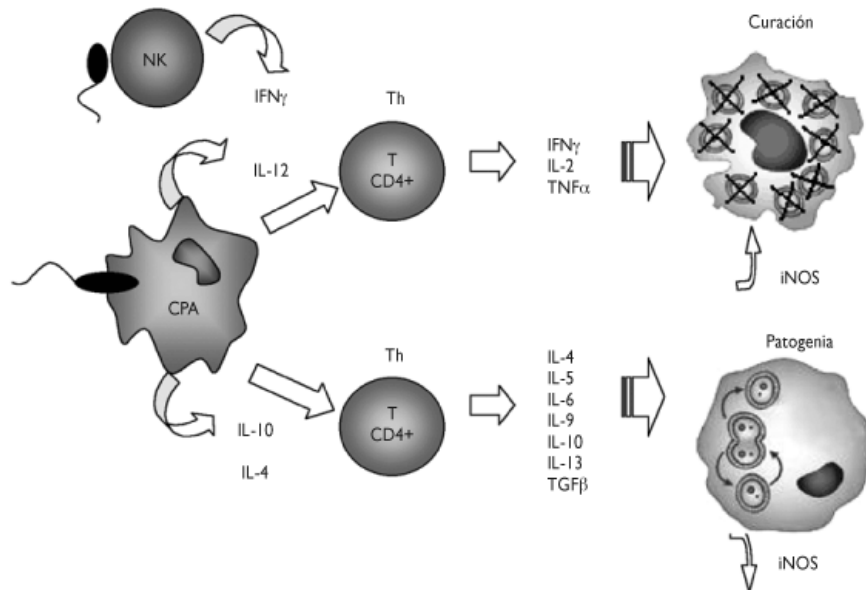
A diferencia de la respuesta inmune de tipo humoral, la respuesta mediada por células cumple un papel protector contra las infecciones por Leishmania. La respuesta específica de células T es la que se asocia con el control de la infección y la resolución de las lesiones. Al parecer, las células que permanecen 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 prolifera y produce  $IFN\gamma$  e IL-2. Estas citoquinas y otras producidas por las células infectadas tales como  $TNF\alpha$  y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSF) activan la célula infectada para que sea ella la que destruya y elimine los amastigotes que tiene en su interior.<sup>(99)</sup>

## 5. Papel de las células T CD4+ en infección por Leishmania

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado, y dependiendo del tipo de célula presentadora de antígeno, de los niveles de citoquinas endógenas y de la naturaleza del antígeno reconocido, las células T ayudadoras CD4+ proliferan y secretan un patrón de citoquinas definidas que las diferencia en subpoblaciones de células Th1 y Th2, cada una de ellas con funciones efectoras diferentes. Actualmente se desconocen los factores exactos que dirigen o determinan la expansión de una u otra subpoblación de células Th. Sin embargo, se ha observado que cuando existe una gran cantidad de antígeno, cuando éste es soluble, o cuando el linfocito B se comporta como célula presentadora de antígeno, la respuesta es de tipo Th2. Al contrario, la respuesta es de tipo Th1 cuando hay presencia de poco antígeno o la célula presentadora de antígeno es el macrófago o las células dendríticas.

De igual manera, el patrón de citoquinas presente en el sitio de la infección juega un papel decisivo en el desarrollo de células Th1/Th2. Las citoquinas de tipo Th1 participan en la regulación del granuloma y en la activación de macrófagos inflamatorios para aumentar su capacidad microbicida, mientras las citoquinas de tipo Th2 regulan la producción de anticuerpos por los linfocitos B y el desarrollo de una respuesta inmune de tipo humoral. En la leishmaniosis, la eliminación del parásito depende de la activación de la célula hospedera; por lo tanto, la producción de citoquinas activadoras de macrófagos se correlaciona con curación, mientras que la de citoquinas que desactivan el macrófago se correlaciona con enfermedad (Véase fig.14). En esta forma, el mecanismo por el cual se activan las células Th1 o Th2 es importante para dirigir la respuesta inmune hacia protección y curación o susceptibilidad y patogénesis.<sup>(99)</sup>



**Fig.14 Reacción inmunitaria a Leishmania. El modelo murino de la infección señala que la susceptibilidad y Resistencia al patógeno dependen del patrón de citocinas expresado por los linfocitos T.**

**Fuente: Dra. Joséln Hernández-Ruiz, Dpto. de medicina experimental**

La presentación de los antígenos por parte de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de tipo II existentes en las células presentadoras de antígeno a las células T, causa la expansión del protector IFN- $\gamma$ , produciendo una respuesta CD4+ Th1, y se ha pensado durante largo tiempo que esto es esencial para el control de la infección por Leishmania, sin embargo, la presentación por parte de las moléculas del CMH de tipo II sola, no es suficiente para estimular la respuesta de las células T, también se necesitan moléculas coestimuladoras como la unión de B7-1/B7-2 y CD40 (en el macrófago) con CD28 y CD40L (en la célula T) respectivamente.

Después de la presentación antigénica por parte de las moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, las células Th proliferan a través del precursor Th0 hacia células Th1 ó Th2 que difieren en el perfil de producción de citoquinas. De hecho, las células Th1 secretan IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y proteínas inflamatorias de migración como las proteínas MIP y MIP-1; mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y el factor inhibidor de migración (MIF).

Generalmente se acepta que la inducción de una inmunidad protectora frente a la leishmaniosis depende de la producción de IL-12. Esta citoquina dirige la respuesta CD4<sup>+</sup> Th1 e induce la producción de IFN- $\gamma$  tanto por los linfocitos T citotóxicos (CD8) como por células Natural Killer (NK) y células T. El IFN- $\gamma$  media en la protección induciendo la producción de NO en los macrófagos infectados. Los macrófagos secretan otras citoquinas además de IL-12, que no solo regulan la función de los macrófagos de una manera autócrina sino que también juegan un papel importante en la modulación de la adquisición de la respuesta inmune, por ejemplo, el TNF- $\alpha$  y el factor quimiotáctico activador de monocitos (MCAF) pueden fomentar la actividad leishmanicida de los macrófagos.

En general, la síntesis temprana de IL-4 es necesaria para el desarrollo de la respuesta Th2. En esta respuesta Th2 estimula la inmunidad humoral e inhibe la proliferación de la respuesta Th1 y hace al macrófago poco susceptible para la activación por IFN- $\gamma$ . La regulación de la respuesta humoral significa la activación de los linfocitos B con la formación consiguiente de anticuerpos, principalmente de IgG, pero que son incapaces de contrarrestar el parásito al tener una localización intracelular, por lo que la enfermedad se disemina. La IL-4 no solo disminuye la producción de IL-12 y IFN- $\gamma$  y la expresión de IL-12, sino que también inhibe la producción de NO por los macrófagos, lo que es crítico para la actividad leishmanicida.<sup>(99)</sup>

La leishmaniosis cutánea se caracteriza por un patrón de citoquinas tipo Th1 con producción de IL-2 e IFN $\gamma$  en niveles significativos. La producción de IL-5 es mucho más baja que en los pacientes con leishmaniosis cutánea difusa y el TNF $\alpha$  se produce en buena cantidad, lo que sugiere su participación en la curación de las lesiones. En la leishmaniosis mucosa se ha sugerido que el patrón de citoquinas es una mezcla de tipo Th1 y Th2; sin embargo, cuando se producen ambos patrones de citoquinas, la respuesta Th2 puede predominar sobre la Th1 y la enfermedad puede mantenerse en un estado

crónico. Se ha observado que en esta forma clínica de la leishmaniosis se producen buenos niveles séricos de IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-5 .

La leishmaniosis visceral humana causada por *L. donovani* o *L. infantum* es una enfermedad severa con diseminación generalizada del parásito al sistema retículo endotelial, como bazo, hígado y médula ósea. Los casos subclínicos o asintomáticos están identificados con bajos títulos de anticuerpos antileishmania y pueden bien mostrar una anergia a los antígenos intradérmicos y desarrollar por lo tanto enfermedad, o bien convertirse en seronegativos, sugiriendo una cura espontánea.

La respuesta inmunológica mediada por células en la leishmaniosis visceral se caracteriza por una marcada disminución en la respuesta linfoproliferativa y por ausencia de producción de IL-2 e IFN $\gamma$  . Se ha observado además, una moderada producción de IL-4, la cual desaparece rápidamente, y altos niveles de IL-10. Un estudio reciente demuestra que existe una relación directa entre la producción de IFN $\gamma$  , TNF $\alpha$  e IL-10 en individuos con infección asintomática y ausencia de dicha relación en individuos con antecedentes de leishmaniosis recurrente. Estos hallazgos sugieren que la relación observada en la producción de citoquinas permitiría distinguir una respuesta inmune efectiva o no, más que la misma presencia o ausencia de una citoquina o citoquinas en particular.

Los análisis del perfil de citoquinas sugieren que el sistema inmune del huésped tiene un rol inmunorregulatorio en la expresión de la enfermedad. Así, en la leishmaniasis cutánea localizada, las principales citoquinas producidas son la IL-2 e IFN- $\gamma$ , y en la mucocutánea y la cutánea difusa, la IL-4 e IL-10. Esto se correlaciona con los estudios en modelos murinos en los cuales la producción de IL-2 e IFN-  $\gamma$  (Th1) interviene en la curación de la enfermedad, mientras que las IL-4, IL-5 e IL-10 (Th2) están asociados con la progresión y diseminación de la enfermedad. Así dos subpoblaciones de células T helper en el sistema inmune murino son críticos en la inducción de la resistencia o la susceptibilidad a la infección.<sup>(8 - 61)</sup>

La importancia de la piel como sitio inmunorregulatorio en las tres formas clásicas de leishmaniasis y la vía de señal epidermal es crucial en la determinación de la respuesta inmune relacionada al tipo de citoquinas generado contra los parásitos de *Leishmania*<sup>(16)</sup>.

La resolución de la infección y la protección contra la reinfección en humanos y ratones están reguladas por la expansión de las células T helper CD4+ leishmania específicas tipo Th1 que producen IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos para la destrucción intracelular de los amastigotes. La IL-12 tendría un importante rol en promover el desarrollo de la respuesta Th1 protectora. En modelos de ratones, las células CD8+ leishmania específica secretan IFN- $\gamma$ , que contribuye a la resolución de la infección por *L. donovani*<sup>(74)</sup>.

En estudios de modelos en ratas se ha demostrado que durante las infecciones sistémicas progresivas hay expansión de células T CD4+ del tipo Th2 que secretan IL-4, pero no IFN- $\gamma$  o IL-2 en respuesta a antígenos leishmaniales. La IL-4 suprime el desarrollo de la respuesta Th1 y la activación de los macrófagos por el IFN- $\gamma$ . En pacientes con leishmaniasis visceral, la IL-10, más que la IL-4, es responsable de la supresión de la respuesta Th1. Las células CD8+ leishmania específicas han sido implicadas en la estimulación de la secreción de IL-10 por las células mononucleares de la sangre periférica. La naturaleza crónica de la leishmaniasis cutánea parece ser debida a la respuesta Th2 dominante en el sitio de infección de la piel<sup>(74-61)</sup>.

El mayor mecanismo de defensa inmune que tiene el huésped frente a la leishmania es la activación de los macrófagos por el IFN- $\gamma$  derivados de las células T CD4+. La ausencia de IFN- $\gamma$  es responsable del desarrollo de la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis cutánea difusa. En la leishmaniasis cutánea americana, los linfocitos T producen IFN- $\gamma$ , en respuesta a antígenos de las leishmanias, y activan el macrófago para destruir a las leishmanias. Es posible que el desarrollo de la enfermedad dependa de la desregulación transitoria de la respuesta de las células T durante la fase inicial de la infección<sup>(74)</sup>.

Recientes estudios están descubriendo la importancia de las interacciones entre los microorganismos y las células dendríticas (CD) y el rol central de estas células en la iniciación y regulación de la respuesta inmune antimicrobial. Las CD inmaduras en la piel captan el antígeno y lo procesan para su presentación a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Posteriormente, las CD migran por los nódulos linfáticos transportando el antígeno procesado a las áreas de las células T, diferenciándose en CD maduras con capacidad para estimular las células T en reposo, que da lugar a la producción de citoquinas, como IL-1, IL-6 o IL-12, las que modulan el desarrollo del tipo de respuesta de células T.

En la leishmaniasis, los protozoarios son fagocitados por macrófagos, CD, neutrófilos y fibroblastos. Solo las CD migran por los nódulos linfáticos y transportan el antígeno desde la piel infectada hacia las áreas de las células T y son capaces de proporcionar la principal señal para la iniciación de la respuesta primaria de las células T leishmania específica. Además, las CD retienen los antígenos del parásito de una forma inmunogénica por periodos prolongados, debido al aumento de la estabilidad de complejos péptidos del MHC de clase II, y así permitir la estimulación sostenida de las células T parásito específicas, que mantiene la inmunidad protectora frente a las leishmanias.

Estos hallazgos sugieren que la interacción de la leishmania con las CD es enfocada como iniciadores y reguladores de la respuesta inmune específica. Se ha determinado que la IL-12 en un estadio temprano de la infección es crucial para la determinación de la inmunidad innata, la actividad de las células natural killer (NK) para producir IFN- $\gamma$  y la respuesta adaptativa del huésped vía inducción selectiva de la diferenciación de las células Th1. Este hallazgo es la clave de las CD como reguladores de la inmunidad antiinfectiva y para la elaboración de estrategias para la obtención de vacunas<sup>(62)</sup>.



## 6. Participación de las células CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis

Los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> cumplen un papel central en la defensa inmunitaria, en particular contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos; además, se han relacionado con la eliminación de algunas células tumorales y células con MHC I incompatible en trasplantes. De manera adicional, las células T CD8<sup>+</sup> participan en la patogenia de una amplia variedad de enfermedades. Su función efectora se realiza a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y liberación de citocinas.

Para lograr su función citotóxica, las células T CD8<sup>+</sup> emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como perforina, la cual es capaz de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, lo que resulta en el colapso del potencial de membrana; sin embargo, su papel más importante tal vez sea servir de paso a otras moléculas de los gránulos líticos de la familia de las catepsinas; una de ellas, la granzima B, activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas. La expresión en membrana de FasL/CD95L media el otro mecanismo citotóxico e induce la trimerización de su receptor Fas/CD95 en las células blanco para inducir apoptosis a través de la activación de la caspasa 8.<sup>(113)</sup>

Aunque en menor magnitud de lo que ocurre con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, otro mecanismo de participación de las células T CD8<sup>+</sup> es la liberación de citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10. El patrón de citocinas, así como las diferencias en la capacidad migratoria, han señalado la existencia de dos tipos de linfocitos T CD8<sup>+</sup>: Tc1 y Tc2, tal y como se ha observado en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 y Th2. Además, se reconoce la existencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> supresores, los cuales intervienen en la regulación de la reacción inmunitaria.<sup>(35)</sup>

Algunas evidencias sugieren un papel importante de las células T CD8<sup>+</sup> en la respuesta inmunitaria a los parásitos, por acción directa de mecanismos citotóxicos o a través de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF-alfa, que son citocinas activadoras de macrófagos y favorecen por tanto la muerte de parásitos intracelulares.

En los seres humanos se piensa que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> juegan un papel crucial en la infección. Se ha notificado un elevado número de células T CD8<sup>+</sup> en lesiones y sangre periférica durante la fase aguda de la infección y el proceso de eliminación de *L. major* y *L. mexicana*. Los pacientes infectados con *L. braziliensis* presentan una mayor proporción de células T CD4<sup>+</sup>, en comparación con las CD8<sup>+</sup>, durante la infección activa y en el proceso curativo esta relación cambia hasta casi llegar al equilibrio al incrementarse el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En otro estudio se reconoció que las lesiones de individuos con LCL también infectados con *L. braziliensis* exhiben un gran porcentaje de linfocitos T en apoptosis, y con mayor frecuencia en linfocitos T CD8<sup>+</sup> que en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.<sup>(113)</sup>

Por el contrario, las lesiones de personas con curación espontánea mostraron muy bajo porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> en apoptosis. De manera adicional, se describió un alto porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reactivos a *Leishmania* en los infiltrados inflamatorios y bajo porcentaje en sangre. De modo conjunto, estos hallazgos demuestran que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> participan de forma activa y promueven la curación. Sin embargo, en el caso de la infección por *L. braziliensis*, la cronicidad de la infección parece definirse por la exacerbación de la respuesta celular. Al parecer, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> participan en la regulación de la reacción al correlacionar la elevada frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> con el tamaño reducido de la lesión generada por el test de Montenegro.

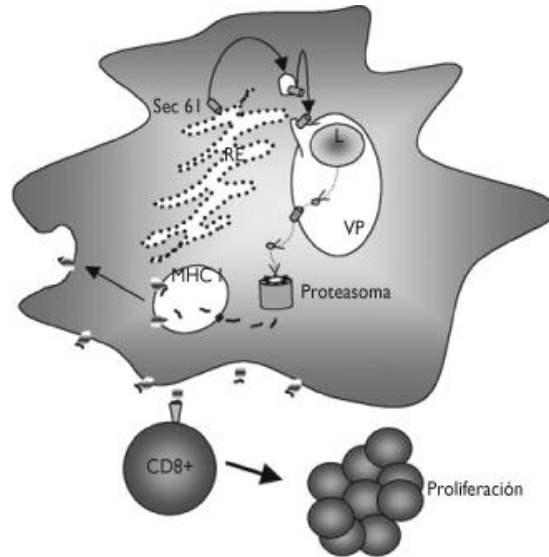
Experimentos recientes realizados con células mononucleares de sangre periférica humana han demostrado que la infección por *L. major* se correlaciona con la producción de IFN- $\gamma$  y apoyado por IL-12, lo cual precipita una respuesta Th1. IL-10 se presenta en

baja cantidad y al parecer regula la producción de IFN- $\gamma$ . El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> no se altera luego de siete días de exposición a *Leishmania*, si bien la proliferación celular así como la producción de IFN- $\gamma$  disminuyen en gran proporción cuando se bloquea la presentación de antígeno por HLA-I. Esto señalaría que la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> es vital en la producción de IFN- $\gamma$ . Este modelo también demuestra la participación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, aunque falta por confirmar su proliferación frente a antígenos de *Leishmania* y determinar los mecanismos efectores que desarrollan.<sup>(113)</sup>

### 7. Vías de activación de las células T CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis

Uno de los puntos de discusión sobre la participación de las células CD8<sup>+</sup> en la leishmaniasis se sitúa en la forma de activación de este subtipo celular. Dado que es necesaria la presentación de antígenos por la vía de MHC I para la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se ha pensado que esta vía interviene en la infección por *Leishmania*. El macrófago es la célula hospedera por excelencia y es allí donde la *Leishmania* se desarrolla y prolifera. Sin embargo, existe la duda sobre la vía de presentación de antígenos del parásito.

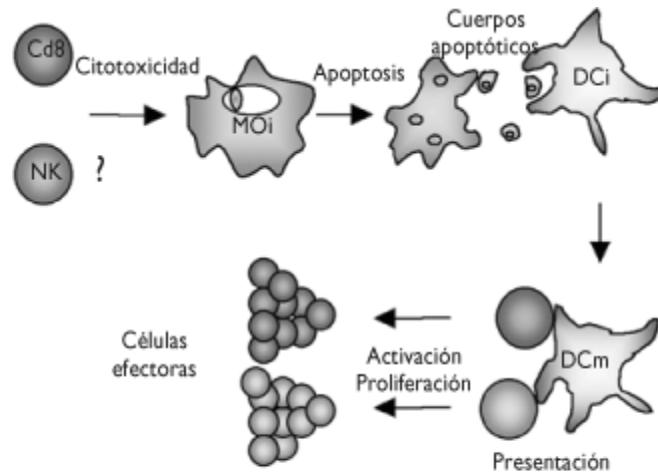
*Leishmania* se alberga dentro de la célula hospedera en un compartimiento fagolisosómico denominado vacuola parasitófora (VP). Aunque se desconoce si el contenido de la luz de la VP puede salir al citosol para degradarse y transportarse al retículo endoplásmico y acoplarse a moléculas de MHC I, se ha descrito en DC y macrófagos una vía que permite la translocación de proteínas desde la luz del fagosoma al citosol, que depende de la proteína chaperona Sec61. Este fenómeno se denominó transpresentación y depende de la fusión del fagosoma naciente con el RE. (Véase fig15a)



**Fig. 15a** Procesamiento de antígenos de leishmania mediante MHC I (Mecanismo directo). Transpresentación de antígenos exógenos a través e Sec61.

**Fuente:** Dra Joselín Hernández-Ruiz, Dpto experimental de medicina

Otra vía de transpresentación de antígenos exógenos implica la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de células infectadas por parte de las CD. Luego de fagocitar cuerpos apoptóticos, las CD adquieren la capacidad de presentar los antígenos que se hallan en dichas células, algo que es detectable dos a cuatro horas después de la fagocitosis. (Véase fig. 15b). Los antígenos deben ingresar al citosol para interceptar la vía convencional de MHC I. De igual modo, se sabe que son las células dendríticas, y no los macrófagos, las que tienen la capacidad de migrar a nódulos linfoides y presentar antígenos de manera eficiente.



**Fig. 15a Procesamiento de antígenos de Leishmania mediante MHC I (Mecanismo indirecto). Fagocitosis de cuerpos apoptóticos**  
**Fuente: Dra Joséln Hernández-Ruiz, Dpto experimental**

Sin embargo, el fenómeno de inhibición de la apoptosis de macrófagos infectados con *Leishmania* constituiría un mecanismo del parásito para evitar la alerta inmunitaria además de garantizar la sobrevivencia de la célula hospedera.

## 8. Función efectora de las células T CD8<sup>+</sup>

Se ha asumido que la principal función protectora de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es contribuir a la producción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, se desconoce si el IFN- $\gamma$  que liberan los linfocitos CD8<sup>+</sup> activados se requiere para controlar la infección por *Leishmania*. Dado que *Leishmania* es un parásito intracelular, es plausible pensar que la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> podría coadyuvar a controlar la infección a través de la lisis de macrófagos infectados por la vía de granzima/perforina o Fas/FasL o ambas.<sup>(113)</sup>

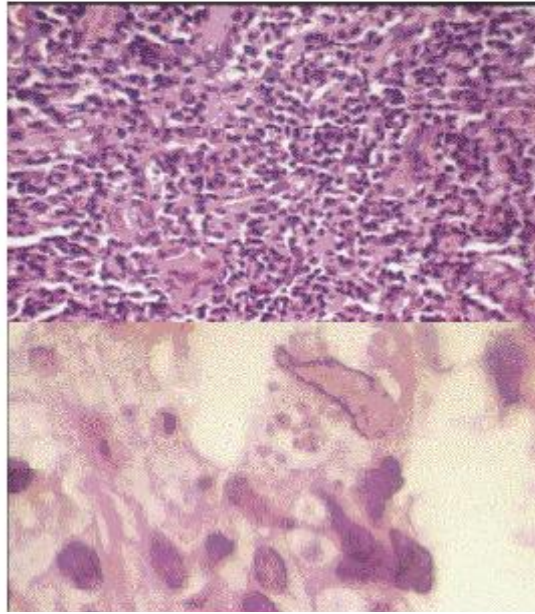
En la leishmaniasis humana son pocos los estudios enfocados en evaluar la citotoxicidad mediada por células y éstos han relacionado la citotoxicidad con daño tisular, no tanto con protección, ya que se ha identificado en pacientes con LMC y no en LC por *L. braziliensis*. También se ha descrito que es posible generar linfocitos T CD8<sup>+</sup>

específicos de *Leishmania* a partir de células T vírgenes estimuladas con macrófagos infectados con *L. amazonensis* y éstos son capaces de lisar macrófagos autólogos infectados. En las lesiones de pacientes con LC infectados con *L. major* se detectó sobreexpresión de FasL en macrófagos y linfocitos T activados, en nexo con expresión de Fas; empero, se vinculó con la formación de la úlcera, ya que se encontró un buen número de queratinocitos en apoptosis. También se ha informado una correlación entre la citotoxicidad *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LC contra macrófagos infectados con *L. major* y la liberación de granzima B.

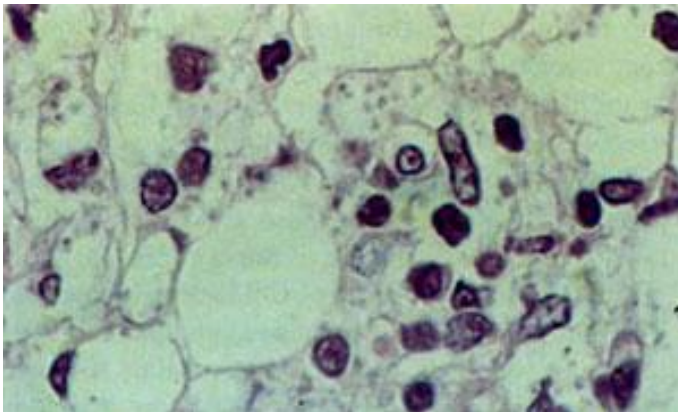
Toda la evidencia señala la participación de la citotoxicidad en la reacción inmunitaria específica y parece relacionarse con la curación. Aún falta determinar la forma en que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> participan en la LCD, en particular si tienen capacidad citotóxica, y si producen algún tipo de citocina distinto del IFN- $\gamma$ . También es necesario confirmar si los linfocitos T CD8 destruyen macrófagos infectados a través de granzima/perforina o Fas/FasL, o ambas, en ensayos de neutralización y si esta citotoxicidad sobre macrófagos infectados ayuda a controlar la infección.<sup>(113)</sup>

## K. HISTOPATOLOGÍA

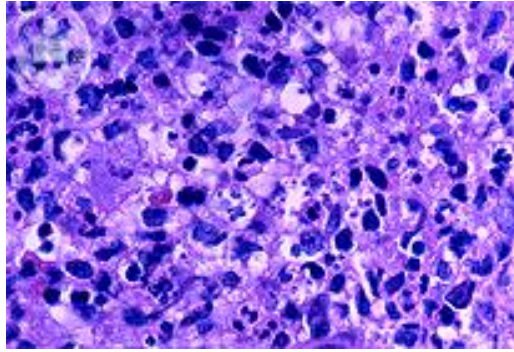
El patrón histológico, tanto en la forma cutánea como en la mucocutánea, es el de una reacción inflamatoria granulomatosa crónica, y el aspecto microscópico varía de acuerdo a la antigüedad de las lesiones y a los factores del huésped. Las lesiones tempranas muestran un infiltrado granulomatoso dérmico intenso de linfocitos, macrófagos parasitados, células epitelioides, algunas células gigantes, células plasmáticas y, a veces, eosinófilo (Véase fig. 16). En la dermis superior, el número de neutrófilos es variable. La epidermis muestra hiperqueratosis, acantosis y, a veces, atrofia, ulceración y abscesos intraepidérmicos. Las lesiones más antiguas muestran un granuloma de células epitelioides e histiocitos con células gigantes ocasionales y el número de macrófagos parasitados es reducido. La hiperplasia pseudocarcinomatosa aparece en las lesiones de larga duración<sup>(96)</sup>.



**Fig.16 Infiltrado granulomatoso dérmico intenso de células mononucleares. HE 10x  
Abajo macrófago parasitado.  
Fuente: Folia Dermatológica Peruana**



**Figura 17: Leishmaniasis cutánea diseminada: cuando hay parásitos en gran cantidad como en este caso, la identificación es fácil. Sin embargo, cuando la lesión es antigua, son cada vez menos el número de parásitos presentes.  
Fuente: Folia Dermatológica Peruana**



**Figura 18: Leishmaniasis muco-cutánea.**  
**Fuente: Facultad de Medicina Universidad de Los Andes Mérida - Venezuela**

Histológicamente se observa en la biopsia tomada de los márgenes de la ulcera un cierto número de histiocitos con citoplasma espumoso acompañados por células plasmáticas y linfocitos. En los histiocitos estaban situados parásitos de tipo de *Leishmania brasiliensis*. Los centros del citoplasma de muchos histiocitos aparecieron ópticamente vacíos, mientras que los parásitos siempre estaban visibles en la periferia. Este efecto se origina por el tratamiento del tejido en la preparación y coloración de las laminas.

## L. ASPECTOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas son variables y están relacionadas a la cepa de leishmania infectante, el medio ambiente y a la respuesta inmune del hospedero. Se describen cuatro formas clínicas: 1) leishmaniasis cutánea; 2) leishmaniasis mucocutánea; 3) leishmaniasis cutánea difusa y 4) leishmaniasis visceral.

### ▪ Leishmaniasis cutánea

La aparición de las lesiones cutáneas algunas veces se encuentra asociada con la picadura del insecto vector en sujetos que viven en áreas endémicas, penetran y permanecen en el nicho ecológico por breves días y, luego, presentan la enfermedad. En promedio, se puede hablar de un periodo de incubación entre 2 y 3 semanas (de 2



semanas a 2 meses o más). Después aparece una pequeña lesión inicial frecuentemente visible, pero no siempre, que tiene asiento en las partes descubiertas, principalmente en la cara y en las piernas. El aspecto típico de la lesión inicial es un leve enrojecimiento circunscrito, 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 transforma en una exulceración y posible punto de partida de un proceso ulcerativo, pero, algunas veces, la lesión regresiona espontáneamente y origina una fase de silencio sintomático algo prolongado. Un trauma local puede activar una infección latente<sup>(75)</sup>.

Se ha observado como signo precoz en los casos de leishmaniasis cutánea la aparición de nódulos linfáticos, en la región correspondiente. El inicio de los signos linfáticos puede aparecer antes, al mismo tiempo o después de la ulceración, y, en casos muy raros, puede ser el único signo de infección de leishmaniasis<sup>(51,75)</sup>. Más raros, son diminutos cordones linfáticos infiltrados, perceptibles a la palpación, entre la lesión primaria y el ganglio infartado.

Esto puede considerarse como un 'complejo primario' que la mayoría de veces pasa desapercibido por su escasa intensidad, o sea una verdadera, pero diminuta, úlcera primaria acompañada por la infiltración linfática regional correspondiente. Algunas veces se ha observado una lesión nodular de tipo subdérmico, sin lesión cutánea visible como punto de partida de un infarto ganglionar manifiesto. Esto indica que el complejo ganglionar es la regla en la enfermedad, aunque no siempre pueda ser evidenciable.<sup>(75)</sup>

Después de varios días, la lesión inicial se ulcera espontáneamente y se cubre de un exudado amarillento y adherente, que dará lugar a la costra. Debajo de la costra, la lesión se extiende en superficie y profundidad. Pueden aparecer lesiones satélites que al unirse a la inicial, originan una úlcera grande. La úlcera característica de la leishmaniasis (Véase Fig.19) es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados y cortados en forma de sacabocado e indurada que recuerda la imagen de un cráter.

Cuando se desprende la costra se observa un fondo granulomatoso, limpio, con exudado seroso no purulento, sin tendencia al sangrado, de color rojizo, a veces amarillento cuando hay depósito de fibrina. No hay signos inflamatorios, como edema o calor local. Si hay una infección bacteriana sobre agregada, la úlcera se torna dolorosa, exudativa y purulenta. La piel alrededor de la lesión presenta aspecto y coloración normales<sup>(51,45,85, 87)</sup>.



**Fig. 19: Úlcera característica de Leishmania**  
Fuente: **Dermatología Peruana 2004: vol 14: No 2**

La localización de la úlcera es más frecuente en las partes expuestas del cuerpo, especialmente las extremidades y cara. En los primeros meses de evolución, la úlcera tiende a crecer hasta un tamaño máximo que está en función de la respuesta inmune del huésped y de la especie de *Leishmania* infectante. Pasan varios meses antes que la úlcera alcance varios centímetros de diámetro. Con frecuencia son afectados los ganglios linfáticos y se producen linfangitis y linfadenitis regionales. Las lesiones se estabilizan y a medida que empieza a prevalecer la respuesta inmune del huésped, la enfermedad tiende a evolucionar a la curación espontánea, en un periodo de seis meses a tres años.<sup>(51)</sup> Solo un escaso porcentaje tiene recidivas cutáneas o complicaciones mucosas de aparición más o menos tardía.

Las especies de leishmania infectante y la respuesta inmune del huésped, determinan las características clínicas y la cronicidad de las lesiones. Las lesiones causadas por *L. (L) mexicana* tienden a ser pequeñas y menos crónicas que las causadas por *L. (V) brasiliensis*. La *L. (V) peruviana* presenta principalmente formas papulofoliculares y nodulares dérmicas; en la leishmaniasis causada por *L. (V) brasiliensis* predomina la forma ulcerosa franca<sup>(75)</sup>. La leishmaniasis causada por *L. (V) guyanensis* origina úlceras múltiples, que sin tratamiento pueden extenderse por la cadena linfática de forma similar a la esporotricosis; en un porcentaje bajo muestra tendencia a la forma mucocutánea. La *L. (V) panamensis* produce lesiones ulcerosas que no tienden a la curación espontánea y afectación linfática en forma de rosario. La leishmaniasis producida por la *L. (L) amazonensis* rara vez produce enfermedad en el hombre y tiende a producir leishmaniasis cutánea difusa resistente a la curación. La *L. (V) lainsoni* produce principalmente lesiones cutáneas<sup>(51,44)</sup>.

Se ha descrito diversas formas clínicas de lesiones no ulceradas de leishmaniasis, como la papulosa, impetiginosa, verrucosa, nodular, vegetante y mixtas.



**Fig. 20: Forma ulcerosa**  
**Fuente: Folia Dermatol. v.17 n.2 Lima**

**Fig. 21: Forma verrucosa**  
**Fuente: Folia Dermatológica Peruana**



**Fig. 22: Forma ulcera costrosa**  
**Fuente: Folia Dermatológica Peruana**



**Fig. 23: Forma impetiginóide**  
**Fuente: Folia Dermatológica Peruana**



**Fig. 24: Formas multinodulares**  
**Fuente: Folia Dermatológica Peruana**



**Fig. 25: Forma eczimatoide**  
**Fuente: Folia Dermatológica Peruana**

La leishmaniasis cutánea andina produce usualmente sólo lesiones cutáneas. Sin embargo, las membranas mucosas pueden estar ocasionalmente comprometidas, directamente relacionadas a la contigüidad de una lesión con la mucosa, en el caso de lesiones producidas en la cara.

- **Leishmaniasis mucocutánea**

Las manifestaciones clínicas de la forma mucocutánea se presentan muchos meses o años después haber cicatrizado la forma cutánea; ocasionalmente aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel. En Brasil, afirman que el 70% de las lesiones surge en los primeros 5 años después de la aparición de la lesión cutánea. Se describe aparición de lesiones mucosas entre los 20 y 30 años después de la resolución de la lesión primaria. En un tercio de los casos, las manifestaciones mucosas son primarias, sin antecedente de lesión cutánea. Posiblemente la infección primaria ha sido inaparente o como una lesión mínima que pasó desapercibida para el paciente.



**Figura 26: Forma cutánea mucosa**  
**Fuente: Folia Dermatológica Peruana**

Las lesiones mucosas se inician principalmente a nivel del tabique nasal cartilaginoso (septum cartilaginoso) y, raramente, en el piso de la nariz. 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. Hay hipertrofia vascular y de los orificios pilosebáceos, que produce abundante seborrea. 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.

El eritema, edema y la infiltración producen aumento del volumen de la punta de la nariz y el ala, que puede sobrepasar el surco nasogeniano. A esta nariz grande de la leishmaniasis se la conoce con el nombre de 'nariz de tapir'. La perforación del tabique nasal y el achatamiento de la nariz sin ulceración son propias de la leishmaniasis mucocutánea (espundia) y no son observadas en la leishmaniasis cutánea andina, en la que, de preferencia, las alas de la nariz son carcomidas.

Los pacientes con compromiso nasal presentan, como sintomatología, catarro nasal, ardor, prurito y respiración forzada. Al examen, se aprecia la mucosa nasal congestionada, una costra hemorrágica o una úlcera granulomatosa infiltrada. Si hay infección sobre agregada, la secreción es purulenta. Si la enfermedad progresa y se profundiza, el proceso se extiende del vestíbulo al labio superior, paladar, pilares, úvula y la garganta. El labio superior suele ulcerarse y destruirse poco a poco y compromete parte de la nariz (Véase Fig.26). Las lesiones del paladar son más frecuentemente proliferativas que destructivas; la úvula suele hipertrofiarse, ulcerarse o destruirse; pero, las lesiones linguales son muy raras.

Cuando se afecta la garganta, la voz es ronca y hay dificultad para respirar y deglutir los alimentos. También se puede hallar compromiso gingival e interdentario. Las lesiones de la hipofaringe, laringe y tráquea se caracterizan por un compromiso de los repliegues aritepigloticos y aritenoides, que dan lesiones hipertrofiantes que producen disfonía, afonía y asfixia. La epiglotis también puede estar comprometida y las cuerdas vocales infiltradas<sup>(51)</sup>. Si no hay tratamiento, la enfermedad puede llevar a la muerte.

La leishmaniasis mucocutánea, en los primeros años de su evolución, no afecta el estado general del paciente, el que puede realiza su labor normalmente. Sin embargo, cuando las lesiones mucosas están muy avanzadas y comprometen la mucosa de la boca y la laringe, la respiración y la alimentación, el estado general del enfermo se altera.

LCM, descrita por primera vez en Bolivia por el Dr. Manuel Antonio Vaca Diez en 1.876<sup>(26)</sup>; se la comienza a estudiar en la guerra del Acre, cuando se observaron muchos casos en el Río Mapiri y el territorio de Colonias, Elias Sagárnaga (1.904), Adolfo Flores (1.904); Arturo Ballivian Otero (1.905), Jaime Mendoza (1.906); quienes utilizaron el término ESPUNDIA para identificar la “Ulceras Tropical” de cualquier origen<sup>(6)</sup>; años después Escomel (1.911) verificó la presencia del parásito amastigote en algunos pacientes que tenían “Espundia”, privatizando este término para referirse a la Leishmaniasis Tegumentaria Americana.

La LCM es una zoonosis producida por la *Leishmania (V) braziliensis* (Vianna 1.911); de amplia distribución geográfica desde América Central hasta el Norte de la Argentina (Nicaragua, Honduras, Guatemala, Costa Rica, Belice, Venezuela, Paraguay, Perú, Ecuador, Colombia, Brasil, Argentina y Bolivia); se caracteriza por presentar una inmunidad celular exacerbada, que se traduce clínicamente en lesiones cutáneo mucosas destructivas y desfigurantes de la región oral y nasofaríngea, que aparecen tardíamente, después de haber cicatrizado las úlceras primarias (puerta de entrada del parásito); estas formas presentan un granuloma que esta constituido por macrófagos y linfocitos con muy pocos parásitos.

- **Leishmaniasis cutánea difusa**

La leishmaniasis cutánea difusa ocurre en un huésped anérgico con pobre respuesta inmune celular. La enfermedad 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 verrucosas de límites imprecisos, que se confunden con la piel normal, dan el aspecto de la lepra lepromatosa. La enfermedad no invade órganos internos<sup>(25,85,84)</sup>.

La leishmaniasis cutánea difusa puede ser causada por *L. aethiopicum*. En América Central y Sudamérica es más comúnmente causada por la *L. mexicana amazonensis*.<sup>(25)</sup>



El examen histopatológico muestra frecuentemente atrofia de la epidermis y granulomas bien constituidos con predominio de células de citoplasma vacuolado llenas de parásitos, en la dermis<sup>(25)</sup>. Las lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento.<sup>(51)</sup>

La LC y LCD tiene como agente etiológico a la Leishmania (*L. amazonensis*), este parásito causa lesiones cutáneas y eventualmente cuando el huésped presenta anergia, (gen del complejo HLA marcador de susceptibilidad) causa lesiones difusas.

El parásito se desarrolla rápidamente (48 horas) en los medios de cultivo con masivas producciones de promastigotes; en el animal de experimentación produce importantes lesiones a partir de las cuatro semanas de inoculación, con desarrollo de lesiones nodulares sin ulceración. La Leishmania (*L. amazonensis*) tanto en el humano como en el modelo murino, presenta lesiones cutáneas ricas en parásitos, intra y extra celulares fáciles de observar por el frotis diagnóstico.

En Bolivia en el foco de los Yungas consideramos que existen muchos otros casos que no se detectan por falta de experiencia del personal de salud; existen evidencias de que la mayoría de las infecciones son sub. clínicas u oligosintomáticas y solamente un pequeño número de niños tiene una infección activa clínicamente detectable, al igual que la presencia de lesiones cutáneas debidas a Leishmania (*L. chagasi*).

En Bolivia se realizaron ocasionales reportes del hallazgo de este parásito en el departamento de Santa Cruz , recientemente se describió un foco con alta incidencia de la enfermedad en la Provincia Inquisivi del Departamento de La Paz (1.500 a 2.000 m.s.n.m.), con el estudio de 172 pacientes con úlceras activas, 11 con cicatrices y ninguno con lesiones mucosas, las características clínicas de la lesión suelen confundirse con las úlceras primarias de la LCM producidas por *L. (L) braziliensis*, la úlcera suele cicatrizar espontáneamente al cabo de 12 meses o más y dejar una cicatriz característica.

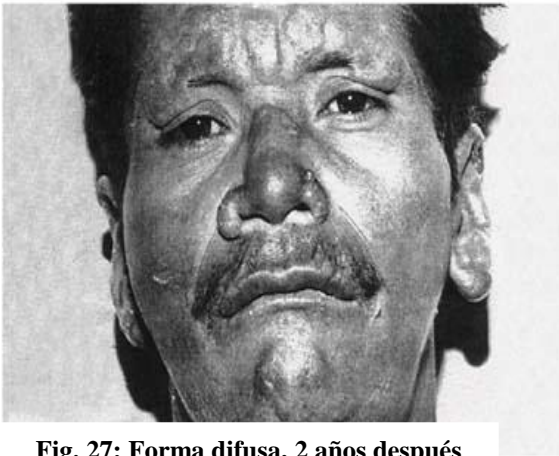
Ocasionalmente cuando el paciente presenta un defecto de los mecanismos de la inmunidad celular, especialmente supresión de los monocitos en la respuesta linfocítica específica ante el antígeno, se produce una enfermedad inmunosupresiva, denominada Leishmaniasis pseudolepromatosa o Leishmaniasis difusa anérgica; esta muy rara enfermedad fue descrita en América tomando en cuenta su particularidad clínica, anatómica patológica y parasitológica por Convit en Venezuela (1.945); Silva en Brasil (1.945); Prado Barrientos en Bolivia (1.948) <sup>(76,77)</sup>; en la actualidad se han descrito nuevos casos en otros países: Belice, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, apoyados en el análisis de isoenzimas y anticuerpos monoclonales <sup>(71)</sup>.

En las lesiones de estos pacientes, se observan amastigotes en gran cantidad, que llenan las vacuolas de los macrófagos (células espumosas), los linfocitos son raros y existe ausencia de necrosis y ulceraciones, en los medios de cultivo el crecimiento del parásito es fácil y exuberante. Los reservorios demostrados son roedores (*Dasyprocta*, *Heteromys*, *Nectomys*, *Oryzomys*, *Proechimys*) y marsupiales (*Caluromys*, *marmosa*, *Metachirus*) <sup>(71)</sup>. En Bolivia se pudo aislar y tipificar el parásito del *Oryzomys capito*. Los insectos incriminados en la transmisión de la enfermedad en sur América son la *Lutzomyia flaviscutellata* <sup>(71,93)</sup>.

El aspecto clínico de la LCD se caracteriza por: Una lesión cutánea inicial (úlceras primaria) a partir de la cual se observan lesiones satélites masivas en todo el cuerpo. Presencia de lesiones pápulares, placas infiltradas y principalmente muchos nódulos sin ulceraciones, similares a la lepra lepromatosa. Las lesiones nodulares lentamente se transforman en escamosas, rugosas y gruesas placas queiloideas, no atacan las mucosas, no existe compromiso visceral

Presentan anergia específica contra el antígeno *leishmania*; la intradermoreacción de Montenegro (IDR – Leishmanina) da una reacción negativa. Presenta resistencia a la

quimioterapia (Glucantime y Anfotericina B). El cuadro clínico avanzado provoca grandes y numerosas lesiones en la cara que dan la característica de fascies leonina (similar a la lepra), (Véase Fig. 27-28). Evolucionan lentamente, diseminándose inexorablemente en todo el cuerpo con excepción de las palmas y plantas de los pies.



**Fig. 27: Forma difusa, 2 años después de iniciada la enfermedad.**  
Fuente: Folia Dermatológica Peruana



**Fig. 28: Forma difusa, el mismo paciente 20 años después.**  
Fuente: Folia Dermatológica Peruana

En Bolivia se ha registrado leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa, y las tres formas clínicas están ampliamente difundidas. Hasta hace poco, las dos terceras partes de la población vivía en tierras altas, en zonas no endémicas (no se han capturado flebótomos a mb de 2500 metros de altitud). Los focos viejos, que presentan una baja tasa de transmisión pero con afección frecuente de las mucosas, se encuentran a altitudes medias (1200 a 1500 m) en los valles de los Yungas de la cordillera de los Andes. Hace algunos años la situación cambió radicalmente como consecuencia de una intensa migración de la población a la nueva zona de asentamientos humanos en las tierras bajas tropicales. Por razones económicas, las personas que trabajaban como mineros tuvieron que dedicarse a la agricultura.

Así, diez nuevos focos, sumamente activos, se hallan ahora en las tierras bajas tropicales, donde existe un contacto muy estrecho entre el hombre y el bosque primario.

La transmisión se produce principalmente dentro de las viviendas y durante la noche (la mayoría de 10 casos corresponden a niños de ambos sexos, que presentan lesiones múltiples en la cara). Se sospecha que el vector es *Lu. nuneztovari anglesi*. Se han estudiado focos en dos zonas de tierras bajas, una en el departamento de La Paz (Alto Beni) y otra en el departamento de Santa Cruz (Yapacani).

- **Leishmaniasis visceral**

La leishmaniasis visceral es una enfermedad parasitaria sistémica que compromete la vida, causada por el complejo *L. donovani* y transmitida por mosquitos flebótomos. La enfermedad es endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo. El complejo *Leishmania donovani* incluye a la *L. donovani* en el subcontinente Indio, Asia y África; a la *L. infantum*, en el mediterráneo y *L. chagasi*, en Sudamérica. En el Oriente medio se han encontrado cepas de *L. trópica* que causan enfermedad visceral. La leishmaniasis visceral ocurre esporádicamente en áreas endémicas rurales, pero epidemias en gran escala se han asociado al hambre, migraciones en masa y alteraciones ecológicas, las que han propiciado interacciones entre los reservorios, mosquitos y seres humanos.

Después de la picadura del vector, existe un periodo de incubación que varía de 4 a 10 meses. En muy pocos casos se encuentran lesiones en la puerta de entrada, ya que la mayoría de las veces pasa desapercibida y tiene una evolución crónica. La progresión a leishmaniasis visceral típica usualmente ocurre entre los 3 y 8 meses después de la infección; aunque se han reportado casos tempranos, como de dos semanas. Sin embargo, después de la infección la mayoría de los casos permanece asintomática o está asociada con síntomas leves que, eventualmente, se resuelven en forma espontánea.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral típica están asociadas con fiebre, la que casi siempre es progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles, que también duran semanas. Posteriormente, la fiebre se torna persistente y ondulante. Existe progresivo deterioro del huésped, palidez

y hepatoesplenomegalia. En la fase crónica, la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa iliaca derecha, con abultamiento considerable del abdomen. Existe una linfadenopatía generalizada, en especial de los ganglios mesentéricos, epistaxis, hemorragia gingival, edema y ascitis. La leishmaniasis visceral a menudo es fatal si no se efectúa tratamiento adecuado. La piel se encuentra hiperpigmentada. Los hallazgos de laboratorio incluyen anemia normocítica normocrómica, neutropenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia y elevación de las transaminasas.

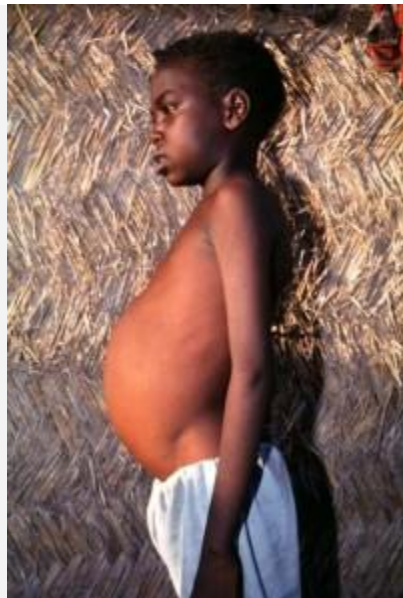
Desde el punto de vista inmunológico, se ha establecido que la leishmaniasis visceral está asociada con anergia celular, tal como lo indican las pruebas cutáneas negativas a antígenos de leishmania. La inducción del factor de transformación del crecimiento-beta y la IL-10 con propiedades inactivantes de los macrófagos puede ser la clave de esto. El control de la leishmaniasis visceral depende de la magnitud de la respuesta Th1 y de las citoquinas liberadas tempranamente en el curso de la infección. Datos recientes indican que la susceptibilidad a la leishmaniasis está genéticamente determinada. <sup>(51,30,67)</sup>

En Bolivia en 1973, Velasco <sup>(94)</sup>, revisó la fauna flebotomina en la zona de los Yungas durante la estación de invierno (julio y agosto), observó por primera vez la presencia de *L. longipalpis* en forma común y difundida (65% de las capturas); sin embargo fue Le Pont <sup>(40,43)</sup> quien dedica más de una quincena de años al estudio entomológico de los flebótomos de Bolivia, quien describió sus hábitos domésticos y peri domésticos, su abundancia en época seca, su actividad albo - crepuscular, sus moderados índices de zoofilia y antropofilia y sus tasas de infección que varían entre 0,19 a 4,2.

El reservorio identificado en Bolivia en el ciclo doméstico es el perro, no se pudo demostrar algún reservorio salvaje; en otros países se incrimina a los canideos salvajes y (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*). El primer caso autóctono de Leishmaniasis visceral en las Américas fue descrito por Mignone (1913) en Paraguay; en Bolivia existían presunciones de la existencia de esta enfermedad <sup>(14)</sup>; situación que fue definida en 1.982 <sup>(13)</sup>, describiendo a un niño de 2 años, natural de Chimasi (Sur Yungas), que

presentaba: fiebre, astenia marcada, anemia, palidez, pérdida de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, poli adenopatías, de 6 meses de evolución progresiva; habiendo realizado diferentes exámenes se observaron formas amastigotes típicas en un frotis de médula ósea, que se confirmó con el aislamiento del parásito en medio de cultivo, inoculación al hámster y tipificación por isoenzimas (13 enzimas). A la fecha, se han descrito una decena de otros casos similares.

En el ámbito mundial en la actualidad existe una reemergencia de la enfermedad, describiéndose casos en las ciudades y en zonas geográficas anteriormente no endémicas, en América Latina <sup>(15)</sup>, se considera que se diagnostican más de 16.000 nuevos casos por año .<sup>(31)</sup>



**Fig. 29: Leishmania visceral**  
**Fuente: Enfermedades olvidadas.**



**Fig. 30: Leishmania visceral**

### **M. DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS**

La aproximación diagnóstica más exacta considera tres criterios que deberán abordarse en el siguiente orden:

1. Antecedentes epidemiológicos,
2. Cuadro clínico sugestivo de leishmaniasis
3. Exámenes de laboratorio: métodos directos e indirectos <sup>(4,81)</sup>.

Las manifestaciones clínicas son variables y están relacionadas en parte a la especie de *Leishmania*, al medio ambiente y a la respuesta inmune del hospedero. Las formas clínicas ya descritas corresponden a: leishmaniasis cutánea, mucocutánea, cutánea difusa y visceral. La localización y el diagnóstico clínico precoz previenen la aparición de complicaciones y secuelas destructivas.

- Caso probable. Caso de leishmaniasis diagnosticado bajo criterio clínico-epidemiológico, sin confirmación por exámenes de laboratorio. <sup>(4,81,11)</sup>
- Caso confirmado. Caso probable que sometido a exámenes parasitológico, inmunológico e histopatológico o cultivo demuestra positividad a la infección por *Leishmania*. <sup>(4,81,11)</sup>

## 1. Diagnóstico de laboratorio

Siempre se debe tener en cuenta que los procedimientos empleados en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) dependen, en gran parte, de la finalidad e infraestructura del laboratorio en que se trabaja. Por otro lado, se sabe que, debido al polimorfismo clínico de la LTA, la obtención de las muestras variará según los métodos de demostración y aislamiento de los parásitos<sup>(11)</sup>. Los exámenes de laboratorio se agrupan en directos o parasitológicos e indirectos o inmunológicos.

### a. Métodos directos o parasitológicos

En el diagnóstico parasitológico hay dos alternativas. La primera es demostrar que el paciente está albergando la leishmania, mediante la visualización, en el frotis o en la histopatología, de amastigotes en tejidos infectados. La segunda opción es intentar el aislamiento directo de los promastigotes en cultivos in vitro de las lesiones sospechosas<sup>(4,81)</sup>.

### b. Investigación de amastigotes

- En las lesiones cutáneas

La úlcera es la más frecuente presentación clínica de la LTA. Independientemente de la especie de leishmania causante, las lesiones, por lo general, se encuentran contaminadas por hongos, bacterias o micobacterias. Por ello, se debe realizar una buena asepsia, previa a la toma de muestra. Cuando los parásitos circulantes en el área endémica pertenecen al subgénero *Viannia*, la eficiencia de visualización y aislamiento es menor en los frotis si se compara con las leishmanias del subgénero *Leishmania*, debido a las densidades parasitarias de 18 a 52% y de 30 a 40%, respectivamente. <sup>(69,75)</sup>

La positividad de la histopatología con hematoxilina-eosina está alrededor del 48% en el Perú; sin embargo, existen reportes de que en Brasil solo se alcanza entre 18 y 28% en leishmaniasis cutánea. La técnica de inmunoperoxidasa indirecta (IMPI) es muy eficiente



en la observación y localización del parásito, con 61% de positividad, y si la lesión tiene menos de 3 meses de evolución, puede alcanzar el 75% <sup>(41,86)</sup>.

- En las lesiones mucosas

En relación con las formas mucosas únicas o múltiples, los procedimientos generalmente utilizados son la biopsia con ayuda de pinzas cortantes especiales (cutting biopsy punch) y frotis de las biopsias. La *L. (V) brasiliensis* es difícil de diagnosticar en los granulomas mucosos. Llanos-Cuentas en Perú, reporta 48% de positividad en lesiones mucosas únicas y 72,7% en lesiones múltiples <sup>(41)</sup>, mientras que Cuba, en Brasil, halla 27,4% en frotis de las biopsias y 16% en la histopatología <sup>(11)</sup>. En Bolivia se publicó una positividad de 17,7% para los frotis y 28,4%, para la histopatología <sup>(18)</sup>. Marsden llama la atención que es más fácil detectar los parásitos en lesiones mucosas múltiples, que en lesiones únicas de *L. (V) brasiliensis*, lo cual también fue reportado por Dimier-David <sup>(66,95)</sup>.

### c. Investigación de promastigotes

De las fases evolutivas de *Leishmania*, la forma promastigote es la más fácil de ser cultivada in vitro, en ella se hacen la mayoría de las investigaciones parasitológicas. Ya en la década del 70, era opinión generalizada que los parásitos pertenecientes al hoy, subgénero *Viannia* (complejo *brasiliensis*), eran difíciles de cultivar. Este hecho era completamente opuesto a la facilidad con que se cultivaban las leishmanias del subgénero *Leishmania* (complejo mexicana) en cualquier medio agar sangre. Hoy sabemos que no existe un único medio de cultivo artificial capaz de reunir características tales que consiga cumplir los objetivos enunciados. Por tanto, es recomendable que cada área endémica de LTA, ensaye primero algunos medios conocidos por su sensibilidad. Esto permitirá una mayor eficiencia futura en el aislamiento de los parásitos que circulan en el foco de transmisión. Los medios de cultivo empleados pueden ser monofásicos (Eagle, MEM, 19TC, el medio RPMI 1640 y el Schneider), o bifásicos (Agar sangre-NNN, Agar sangre USAMRU, medio de Senekjie). <sup>(9,33)</sup>

#### d. Métodos de cultivo

- Aislamiento primario de las lesiones cutáneas

La sensibilidad del método está directamente relacionada con la correcta selección del medio más apropiado y con la habilidad del investigador para escoger el lugar de la lesión que sea la de mayor actividad parasitaria (la que sólo surge después de años de experiencia y práctica)<sup>(11)</sup>. Para la recolección de la muestra para el cultivo, podemos usar la técnica de aspiración de las lesiones por el procedimiento descrito por Hendricks<sup>(33)</sup> o a través de una biopsia punch y posterior triturado en una solución de suero fisiológico y antibióticos. Es importante señalar que la excesiva presencia de sangre en las muestras colectadas es perjudicial para el desarrollo del parásito. Según Evans<sup>(22)</sup>, la sangre contiene proteínas séricas altamente inhibitorias para el crecimiento de los promastigotes de leishmania.

- Aislamiento primario de las lesiones mucosas.

Es bastante difícil aislar *Leishmania* de los granulomas mucosos, en medios de cultivo, tanto por la contaminación de bacterias y hongos ambientales como del huésped. Por ello los cultivos deben contener antifúngicos (5-fluorocitosina) y antibióticos (gentamicina y estreptomycin) a 4°C durante 24 horas. Esto se realiza previo a la inoculación de los tubos de cultivo. Sin embargo, la eficacia es poco significativa. El mejor hallazgo lo reporta Cuba en Brasil con 30%<sup>(10)</sup>, mientras que Dimier-David<sup>(18)</sup> en Bolivia, consiguió 23% de positividad en medio NNN complementado con Schneider y antibióticos.

- Uso de la inoculación en hámsters en el diagnóstico de LTA

Con el empleo de este método, Cuba reporta 60% de positividad en animales inoculados con la suspensión de la biopsia triturada, y de solo aproximadamente 35%, cuando proceden a aspirar con aguja y jeringa las lesiones e inmediatamente inoculan los

animales <sup>(11)</sup>. En Perú, Llanos-Cuentas reporta 69,9% de positividad <sup>(41)</sup>. Para comprobar el parasitismo del hámster inoculado no basta hacer un simple frotis del lugar clínicamente positivo, es necesario cultivar, ello porque el frotis apenas demostrará 25% de animales con amastigotes <sup>(11)</sup>.

En la leishmaniasis, tanto cutánea como mucosa, el éxito en el aislamiento es inversamente proporcional al tiempo de duración de la enfermedad. Se debe admitir que no existe una técnica de aislamiento que reúna todas las características necesarias a fin de diagnosticar parasitológicamente el 100% de los pacientes con LTA. La opinión generalizada es que el máximo rendimiento se consigue con la combinación de 2 ó 3 de ellas. Si a esto se asocian la prueba de Montenegro y la serología por Elisa, el diagnóstico laboratorial de LTA puede llegar al 90,0% <sup>(11)</sup>.

#### **e. Métodos inmunológicos**

Se basan en la detección de la enfermedad a través de la respuesta inmune celular (intradermorreacción de Montenegro o leishmanina) y/o respuesta inmune humoral a través de anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la enfermedad (Elisa/DOT Elisa, inmunofluorescencia indirecta (IFI) <sup>(4,81)</sup>.

##### **• Intradermorreacción de Montenegro**

Es una reacción de hipersensibilidad tardía que evalúa la inmunidad mediada por células. Consiste en la aplicación de un antígeno extracto soluble preparado a partir de promastigotes procedentes de cultivo. Se aplica intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo izquierdo del paciente y se hace la lectura a las 48 a 72 horas <sup>(4,81)</sup>. Se considera positiva si es mayor de 10 mm. La prueba aparece positiva 1 a 3 meses después de haber adquirido la infección y permanece positiva de por vida en pacientes con LCL y LCM, y es negativa en los pacientes con LCD, forma visceral y en inmunosuprimidos. Tiene un 96% de positividad en los tres primeros años de iniciada la enfermedad <sup>(4)</sup>.

- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y pruebas enzimáticas Elisa**

Estas pruebas detectan anticuerpos antileishmania circulantes en el suero del paciente a títulos bajos. En las lesiones ulceradas por *L. (V) brasiliensis* la sensibilidad a la IFI está en torno del 70% dentro del primer año de iniciada la enfermedad. Algunos pacientes son persistentemente negativos <sup>(11)</sup>.

Las lesiones múltiples, tanto cutáneas como mucosas, están asociadas a títulos más altos. De otro lado, las lesiones mucosas presentan títulos más altos que las lesiones cutáneas y muestran títulos elevados persistentemente <sup>(11)</sup>. Después del tratamiento y la cura clínica en ambas formas de la enfermedad, los títulos caen o desaparecen completamente. Un tercio de los pacientes permanecen seropositivos después de los 30 años de enfermedad. La primera muestra debe recolectarse en el primer contacto con el paciente, la segunda al mes, la tercera a los 3 meses, otra a los 6 y la última al año de la cicatrización de la lesión.

#### f. OTROS

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Es un método que se está usando rutinariamente para confirmar el diagnóstico de leishmaniasis. La identificación puede ser hecha de una biopsia sin requerir necesariamente un cultivo <sup>(83)</sup>. Los resultados comparativos entre la PCR y los métodos de detección parasitológicos muestran una mejor sensibilidad del primero para fines de diagnóstico <sup>(32,49)</sup>.

- **Proliferación Celular**

Los linfocitos de sangre periférica proliferan cuando se cultivan *in vitro* en presencia de mitógenos, antígenos y células alogénicas. Esta propiedad recibe el nombre de blastogénesis o transformación blástica. Los mitógenos más utilizados son las lectinas, que estimulan en forma no específica la linfoblastogénesis de múltiples clones celulares

(respuesta policlonal). Principalmente son utilizados: Fitohemaglutinina (PHA, derivada del *Phaseolus vulgaris*) y concanavalina A (Con A, derivada de la *Canavalia ensiformis*). Ambas lectinas estimulan principalmente linfocitos T, pero existen evidencias experimentales que indican que cada una de ellas actúa sobre subgrupos diferentes de los mismos. La PHA estimula preferencialmente linfocitos T cooperadores CD4+. El mitógeno Con A, por el contrario, parece estimular principalmente a los linfocitos T citotóxicos CD8+. También son utilizados mitógenos que estimulan selectivamente linfocitos B, como es el lipopolisacárido (LPS) derivado de la pared celular de *Escherichia coli*.

#### **g. Diagnóstico diferencial**

Es importante realizar un diagnóstico diferencial cuidadoso con otras entidades que pueden producir lesiones semejantes. Se debe considerar el medio geográfico donde se encuentra trabajando el paciente y cuales son las patologías más frecuentes en esa zona, que podrían confundirnos con leishmaniasis.

- Leishmaniasis cutánea andina: infecciones de piel ocasionadas por bacterias piógenas, úlceras por vasculopatía, lepra lepromatosa, tuberculosis, sífilis secundaria o terciaria, micosis superficiales, sarcoidosis y carcinomas de piel.
- Leishmaniasis mucocutánea: infecciones de mucosas ocasionadas por paracoccidiodomicosis, histoplasmosis, tuberculosis nasal, sífilis terciaria, granuloma letal de la línea media, pian, hanseniasis y neoplasias.
- Leishmaniasis visceral: infecciones infantiles como malaria crónica, linfomas y leucemias.

## N. TRATAMIENTO

Gaspar Vianna, en 1909, inicia el tratamiento específico de la leishmaniasis utilizando tártaro emético y obtiene la cura de pacientes con leishmaniasis cutánea y/o mucosa. Este medicamento ocasionaba severos efectos colaterales. Bramachari, en 1920, sintetiza el primer antimonial pentavalente, pero los antimoniales trivalentes fueron las drogas utilizadas, con efectos colaterales menos intensos que el tártaro emético, presentando toxicidad cardíaca, hepática y del sistema nervioso central. En la década de los 40 entra en el mercado farmacéutico los antimoniales pentavalentes, el estibogluconato de sodio (Repodral®/Pentostan®) y N-metilglucamina (Glucantime®).

Para el tratamiento antileishmaniásico se están empleando esquemas de tratamiento alternativo y se están desarrollando nuevos medicamentos. Los esquemas utilizados son:

### 1. Leishmaniasis cutánea andina o uta

- Droga de elección

Los antimoniales pentavalentes, a la dosis de 20 mg Sb/kg de peso/día, vía IV o IM, por 10 días, aplicación diaria. La experiencia que se tiene es con los antimoniales pentavalentes (N- metilglucamina); se presentan en ampollas de 1,5 g. Son empleados por vía IM, cada 12 horas, en ciclos de 10 días cada uno y descanso de una semana. Número de ciclos promedio tres con buenos resultados.

- Drogas alternativas
  - Rifampicina, 600 mg/día, vía oral, por 3 a 4 semanas
  - Dapsona, 3 mg/kg de peso/día, vía oral, por 3 a 4 semanas
  - Ketoconazol, 600 mg/día, vía oral, por 4 semanas

## **2. Leishmaniasis mucocutánea o espundia**

- Droga de elección

Antimoniales pentavalentes (antimoniato de N- metilglucamina, estibogluconato de sodio), a la dosis de 20 a 50 mg/kg de peso/día, IV o IM, por 30 días, aplicación diaria.

- Droga alternativa

Anfotericina B, a la dosis de 0,5 a 1,0 mg/kg de peso/día IV diluido en 500 mL de dextrosa al 5%, hasta un máximo de 50 mg/día y alcanzar la dosis acumulada de 2,5 a 3g.

## **3. Leishmaniasis visceral**

Antimoniales pentavalentes (antimoniato de N- metilglucamina, estibogluconato de sodio), a la dosis de 20 mg Sb/kg de peso/día, IM o IV, por 30 días, aplicación diaria.

- **Antimoniales**

Los antimoniales, desarrollados en 1940, continúan siendo las drogas de elección para el tratamiento de las leishmaniasis. Existen dos sales de antimonio pentavalentes disponibles: el antimoniato de N-metilglucamina y el estibogluconato de sodio. Ambas drogas son similares en eficacia y toxicidad. Sus mecanismos de acción no son bien conocidos, aunque ellos pueden inhibir la glicólisis y oxidación de los ácidos grasos de la leishmania.

El antimoniato de N-metilglucamina, es utilizado en la mayoría de países de América Latina y Francia. Es una droga hidrosoluble, se presenta en ampollas de 5 mL en solución al 30% que contiene 1,5 g de sal antimonial bruta que corresponde a 425 mg de antimonio. Existen controversias con la dosis y de los intervalos de aplicación. Se recomienda usar dosis de 20 mg/kg/día. Es una sustancia de eliminación rápida.

El estibogluconato de sodio, descubierto por Schmidt en 1936, es un gluconato pentavalente de sodio y antimonio, que contiene 30 a 34% de antimonio pentavalente. Es considerada la droga de elección para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral en los países de habla inglesa, incluyendo los Estados Unidos. Se presenta en ampollas de 2 mL/5 mL, que contienen 100 mg de antimonio en 1 mL. La dosis empleada es de 20 mg de antimonio/kg/día.

Entre los efectos adversos de los antimoniales se incluyen debilidad, anorexia, mialgias, artralgias, inapetencia, náuseas, vómitos, plenitud gástrica, epigastralgia, cefalea, mareos, palpitaciones, prurito y cardiotoxicidad, especialmente asociada a dosis altas y tiempo prolongado. Las alteraciones de laboratorio incluyen leucopenia, trombocitopenia, elevación de amilasas, lipasas y de transaminasas hepáticas. El tratamiento debe ser monitorizado, pero la mayoría de las alteraciones se normalizan rápidamente al suspender el tratamiento. Las contraindicaciones incluyen embarazo, cardiopatías, nefropatías y hepatopatías<sup>(34-80)</sup>.

El antimoniato de meglumina también se ha empleado en forma intralesional, con buenos resultados en las formas cutáneas de leishmaniasis, lo que hace que exista un menor riesgo de complicaciones<sup>(64)</sup>.

- **Anfotericina B**

Es un antibiótico poliénico altamente lipofílico que actúa sobre los esteroides y fosfolípidos de las membranas celulares de las células; se emplea como droga de segunda línea en el tratamiento de leishmaniasis resistente a los antimoniales, especialmente en las formas mucocutánea y diseminada difusa.

La anfotericina B se presenta en frascos de 50 mg. Se comienza con 0,5 mg/kg/día y se aumenta gradualmente hasta 1 mg/kg/día en días alternos, sin sobrepasar la dosis de 50 mg por día. Se debe administrar hasta la cura clínica, lo que debe ocurrir cuando se llega a la dosis de 1 a 1,5 g en la forma cutánea y de 2,5 a 3 g en las formas mucosas y



mucocutáneas. La anfotericina B se administra por vía IV diluida en 500 mL de dextrosa al 5%. El paciente debe estar en monitoreo clínico estricto, acompañado de pruebas de laboratorio que permitan evaluar la función renal, hepática, hematológica y cardíaca. Se excreta por vía renal.

Los efectos secundarios son variados, principalmente a nivel renal, anemia y convulsiones. Se presentan frecuentemente fiebre, anorexia, náuseas, vómitos y flebitis. La anfotericina B produce una hipopotasemia importante que puede agravar y contribuir al desarrollo de insuficiencia cardíaca.

La anfotericina liposomal es menos tóxica que la anfotericina B. Los transportadores liposomales de drogas son ideales para el tratamiento de la leishmaniasis, porque las leishmanias viven dentro de los macrófagos<sup>(34)</sup>. La anfotericina está contraindicada en gestantes, cardiopatías, neuropatías y hepatopatías.

- **Pentamicina**

Es una diamidina con un amplio espectro de actividad antiparasitaria. Efectiva contra la leishmaniasis, tripanosomiasis y pneumocistosis. En la leishmaniasis actúa inhibiendo la replicación del cinetoplasto. Tiene alta afinidad por las proteínas tisulares, se acumula en el hígado, riñones, glándulas suprarrenales y bazo. Se elimina por vía renal lentamente, hasta días después de finalizado el tratamiento.

La pentamicina es usada como un medicamento alternativo en los casos que no responden a los antimoniales pentavalentes. Se ha obtenido buenos resultados con bajas dosis en la *L. (V) guyanensis*. La dosis recomendada es de 4 mg/kg/día, vía intramuscular profunda de 2 / 2 días. La duración del tratamiento varía de 5 a más semanas, de acuerdo con la respuesta clínica. Se presentan en frasco ampolla de 300 mg, bajo la forma de dos sales: el mesilato y el isetionato. Se prefiere el isetionato por tener menos efectos colaterales.

Las reacciones adversas más frecuentes son dolor, induración y abscesos estériles en el sitio de aplicación, además de náuseas, vómitos, mareos, adinamia, mialgia, cefalea, hipotensión, lipotimias, síncope e hipoglicemia. Debe ser administrado después de los alimentos, por su acción hipoglicemiante. Se recomienda, durante el tratamiento, realizar exámenes de laboratorio de funciones renal y hepática, glicemia y ECG. Contraindicaciones: gestantes, diabetes, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y enfermedades cardíacas.

- **Aminosidina**

El sultato de aminosidina es un aminoglucósido con actividad leishmanicida. Se ha probado su eficacia en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Fue recientemente usado en la India a la dosis de 16 a 20 mg/kg/día, por 21 días, con una cura del 97%. Estudios realizados en áreas endémicas de *L. (V) brasiliensis*, han probado la eficacia parcial de la aminosidina a los dos años de seguimiento, por lo que esta droga puede convertirse en una alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis. La dosis recomendada es de 16 mg/kg/día, por 21 días.

- **Miltefocina**

Se trata del primer fármaco oral para el tratamiento de la leishmaniasis visceral que cura un 95% de los casos. Probablemente sea la droga más barata que se utiliza en la actualidad y, además, la más sencilla en administrar. La dosis a usar es de 100 a 150 mg, por día, por 28 días. Los estudios han demostrado efectividad hasta del 100% y es una droga bien tolerada.

- **Interferón gama**

En estudios realizados, la inyección diaria de interferón gama combinado con antimoniales pentavalentes ha mostrado aceleración de la respuesta clínica e induce respuesta a largo plazo en los dos tercios de los casos que no responden al tratamiento

con antimoniales pentavalentes solamente. El IFN actuaría como un coadyuvante. El costo limita su uso<sup>(37)</sup>.

- **Ketoconazol**

Antimicótico imidazólico que inhibe la síntesis del ergosterol; ha sido empleado en el tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria americana con resultados contradictorios. La dosis es de 600 mg/día, por 28 días. En las formas mucosas el resultado ha sido pobre usando 400 mg, por día, por 3 meses.

- **Itraconazol**

Antifúngico triazólico como el anterior, actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol de la pared celular. Se ha comunicado resultados buenos en las formas cutáneas de la leishmaniasis tegumentaria americana. La dosis es de 200 a 400 mg/día de 2 semanas a 5 meses. El fluconazol a la dosis de 200 mg/día, por 6 semanas, ha resultado efectivo en las formas de leishmaniasis cutáneas<sup>(3)</sup>.



***DISEÑO  
METODOLÓGICO***

## **VI. DISEÑO METODOLOGICO**

### **A. POBLACION EN ESTUDIO**

La población en estudio estuvo comprendida por diez pacientes, cinco con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea y cinco con cutánea mucosa, internados en el área de Dermatología del Hospital de Clínicas. la media de edad fue de 32, con ocho casos de sexo masculino y dos casos de sexo femenino.

### **B. DISEÑO DEL ESTUDIO**

El presente proyecto fue un estudio experimental piloto de serie de casos.

### **C. ANÁLISIS DE DATOS**

En el proyecto se usó el programa estadístico SPSS 11.5 y planillas de Excel.

### **D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el proyecto se realizó el análisis estadístico con medidas de tendencia central (Promedio, Desviación Standard, etc.).

### **E. FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

PROYECTO ENFERMEDADES INFECCIOSAS UMSA ASDI/SAREC: NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS.

### **F. COMPONENTE ETICO**

En el contexto del proyecto, “ENFERMEDADES INFECCIOSAS UMSA ASDI/SAREC: NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS”, los individuos que

decidieron voluntariamente ingresar al estudio, firmaron previamente el consentimiento informado de acuerdo con los parámetros de la declaración de Helsinki, 1981.

## **G. MÉTODOS**

Los métodos para este estudio comprendieron: 1) cultivos del parásito *L. brasiliensis* 2) la obtención de antígenos y 3) la prueba de MTT para evaluar la proliferación celular sobre células mononucleares del sistema inmune (linfocitos) obtenida de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea.



***MATERIALES  
Y REACTIVOS***

## **VII. MATERIALES Y REACTIVOS ( Equipo, material fungible, reactivos.)**

### **A. MATERIAL FUNGIBLE**

- Tubos Falcom
- Policubetas para cultivo celular de 96 pozos
- Frascos de cultivo de 75 mL

### **B. REACTIVOS**

- Suero fetal bovino inactivado (SFBI)
- Buffer PBS (preparación Ver Anexo #2)
- Penicilina y estreptomicina
- RPMI
- Promastigotes de *L. braziliensis* (WHO/2305)
- Medio de cultivo M-199
- MTT, SDS

### **C. EQUIPOS**

- Campana de flujo laminar Eac-envirco
- Microscopio Olympus
- Centrifuga Eppendorf 5810
- Balanza analítica Gibertini
- pH-metro Ultrasbasic
- Sonicador Sonic y Materials Inc.
- Equipo de esterilización: autoclave
- Estufa de 37°C Fisher Scientific Model 655D.





## VIII. PROCEDIMIENTO

### A. Preparación del medio de crecimiento para *Leishmania braziliensis*.

Se utilizó el medio M199 para cultivar in vitro formas promastigotes de *Leishmania braziliensis*, se procedió a añadir por cada 500 mL de medio M199, 50mL de suero fetal bovino inactivado,  $10^4$ U/mL de penicilina,  $10^4$  ug/ mL de estreptomicina, adenina 5mM, hemina 0,25%, biotina 0,1% y biopterina 0,25 mg/mL.

Las formas promastigotes de *Leishmania* fueron cultivadas in vitro a 28°C, en frascos de cultivo con 5mL del medio M199 ya preparado con una alícuota del parásito.



Fig.31 Frasco de cultivo



Fig.32 Cultivo celular de Promastigotes de *Leishmania* vistos al microscopio

**B. Preparación del extracto crudo (antígenos)**

El lisado de parásitos se obtuvo a partir de formas promastigotes de *Leishmania braziliensis* (WHO/2305) cultivados en medio M199 a 28°C, conteniendo 10% de SFB, penicilina y estreptomina. Los promastigotes fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS 0.15 M, pH 7.5) y se resuspendieron con 10 mL de PBS, el resuspendido se dividió en 2 tubos Falcom de 15 mL.

La suspensión parasitaria del primer tubo fue sometido al proceso de congelación – descongelación, se congeló a -20°C y se descongeló en agua a 37°C, 10 ciclos aproximadamente, se alicuotó y el antígeno total de *Leishmania* se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

La suspensión parasitaria del segundo tubo fue lisada por sonicación, para lo cual se centrifugó por 10 min a 2300 rpm, se desechó el sobrenadante. Se añadió 5 mL de TRIS – HCl 5 mM, y se sonicó con una frecuencia de 2,5 a intervalos de 7 seg por 15 min en baño de hielo, una vez concluido los ciclos de sonicación se centrifugó por 1 hora a 4000 rpm, se alicuotó el sobrenadante y el antígeno total se guardó a -20°C hasta su utilización. El proceso finalizó cuando microscópicamente no se observó ningún promastigote entero.

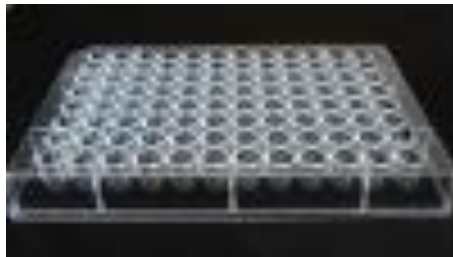
El contenido proteico de ambas preparaciones antigénicas se cuantificó por el método colorimétrico de Biuret, obteniéndose por sonicación 4,5 mg/dL y por congelación-descongelación 17,07 mg/dL.

**C. Cultivo de células mononucleares de sangre periférica frente a Con A y antígenos totales preparados de *Leishmania braziliensis*.**

Se trabajó con células mononucleares de sangre periférica que fueron aisladas de 20 mL de sangre venosa heparinizada de pacientes con diagnóstico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. La sangre se diluyó con PBS 0,15 M pH 7.4, el doble de volumen y se

estratificó con Ficoll-Hypaque 1.077, fué sometido a centrifugación por 20 min a 1500 rpm. Se separó el halo de interfase en un tubo Falcom, se lavó con PBS y se centrifugó por 5 min a 1500 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet añadiendo 5 ml de RPMI, fué sometido a centrifugación por 5 min a 1500 rpm y se repitió el proceso una vez más.

Se evaluó la viabilidad celular con azul tripan, se ajustó a una población celular de  $5 \times 10^6$  cel/mL, las células mononucleares periféricas fueron dispensadas en policubetas para cultivo celular de 96 alveolos estériles por triplicado, a un volumen de 200 uL, en presencia de ConA, y los antígenos obtenidos por congelación-descongelación y el antígeno obtenido por sonicación, además de solo células mononucleares como control negativo



**Fig.33 Policubetas para cultivo celular de 96 pozos**

La concentración inicial de la ConA fue ajustada a una concentración final de 3 ug/mL. La concentración inicial del antígeno obtenido por sonicación fue de 4,5mg/dL y se llegó a una concentración final de 12,5 ug/mL para un volumen de 700 uL. La concentración inicial del antígeno obtenido por congelación-descongelación fue de 17,05mg/dL y se ajustó a una concentración de 12,5 ug/mL para un volumen de 700 uL.

Se incubaron las células a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 Horas.

**D. Evaluación de la proliferación celular de linfocitos utilizando la prueba de MTT, activados con ConA y Antígenos totales de *Leishmania braziliensis*.**

Las células fueron incubadas con 22 uL de MTT por 4 horas permitiendo que la sal de tetrazolio amarillo (MTT) se reduzca en las células metabólicamente activas y forme cristales de formazán insoluble púrpura, se añadió 100 uL de SDS para solubilizar dichos cristales. Al día siguiente fue monitoreada la proliferación luego de la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 545nm a 630 nm. La absorbancia se correlacionó directamente con el número de células presentes en la placa.



**RESULTADOS**

## IX. RESULTADOS

### **Proliferación de linfocitos provenientes de pacientes con diagnóstico de leishmaniasis frente a ConA y antígenos totales obtenidos a partir de cultivos celulares de *Leishmania braziliensis*.**

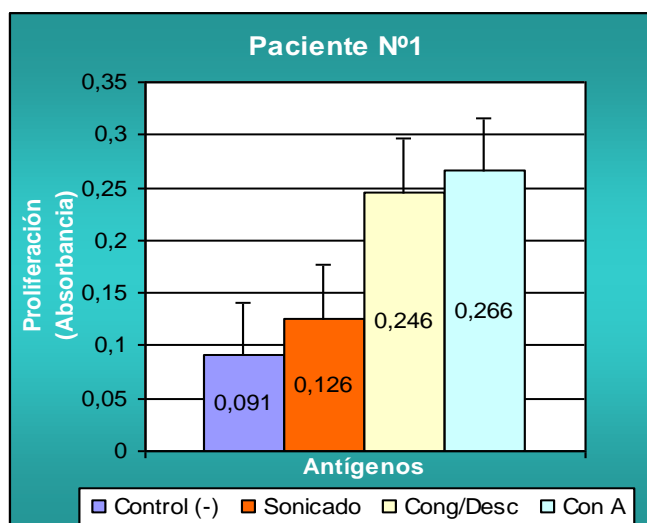
Se procedió al cultivo del parásito *L.braziliensis* y la obtención de antígenos para evaluar cuantitativamente la proliferación celular a través de la prueba del MTT sobre las células del sistema inmune, se aisló y estratificó las células mononucleares de 10 pacientes cuya viabilidad fue del 97%, se ajustó una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL.

Dicha población celular se estimuló con Concanavalina A, el antígeno obtenido por congelación – descongelación y por el antígeno obtenido por sonicación, obteniéndose lecturas de absorbancia, a una longitud de onda de 545 a 630 nm.

La proliferación linfocitaria de 10 pacientes con diagnóstico de leishmaniasis, inducida por Con A y antígenos totales fue analizada y cuantificada mediante la prueba del MTT, donde el tetrazolio MTT compuesto (3 - [4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazolio) se redujo en las células metabólicamente activas a cristales de formazán de tinte púrpura insoluble, se añadió detergente a los pozos para la solubilización de los cristales y las lecturas de absorbancia se pudieron obtener con un lector Elisa. Los datos fueron analizados trazando el número de células en comparación con la absorbancia, lo que permite la cuantificación de cambios en la proliferación celular.

En el paciente N°1 con diagnóstico de Leishmaniasis Cutánea tipo verrucosa se evidenció una baja respuesta linfoproliferativa luego de la incubación con el mitógeno Con A así como también a los antígenos de Leishmania preparados, como se muestra en la fig. 34, en el que se indica el valor de absorbancia promedio obtenido por triplicado con cada uno de los estimulantes de proliferación, presentando valores de absorbancia bajas en comparación a la media. También podemos constatar un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

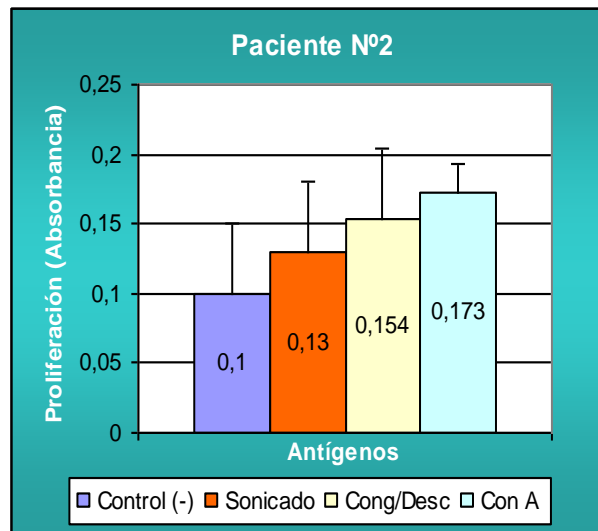
**Fig 34. Paciente N°1, efecto de la ConA y los antígenos obtenidos por congelación/descongelación y sonicación frente a una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL**





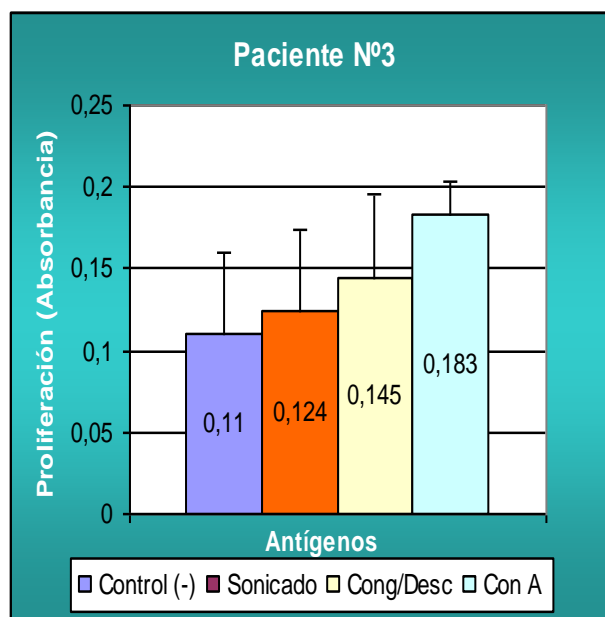
El paciente N°2 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, los resultados obtenidos muestran que la proliferación de linfocitos pre activados con Con A y los antígenos totales, presentaron una baja respuesta según los valores de absorbancia obtenidos en comparación a la media, (ver Fig. 35). Se observa también un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig. 35** Paciente N°2, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL



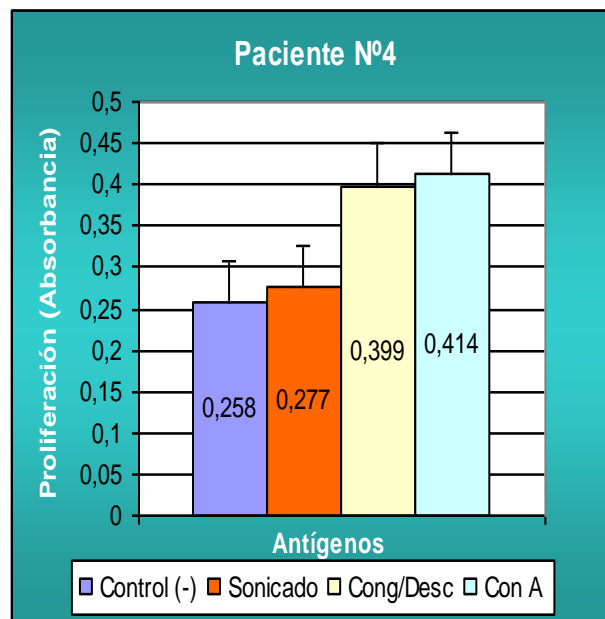
El paciente N° 3 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó baja respuesta linfoproliferativa a la Con A y los antígenos del parásito por la presencia de valores muy bajos de absorbancia con relación a la media, como se muestra en la Fig. 36. Se observa también un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig 36. Paciente N°3, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL**



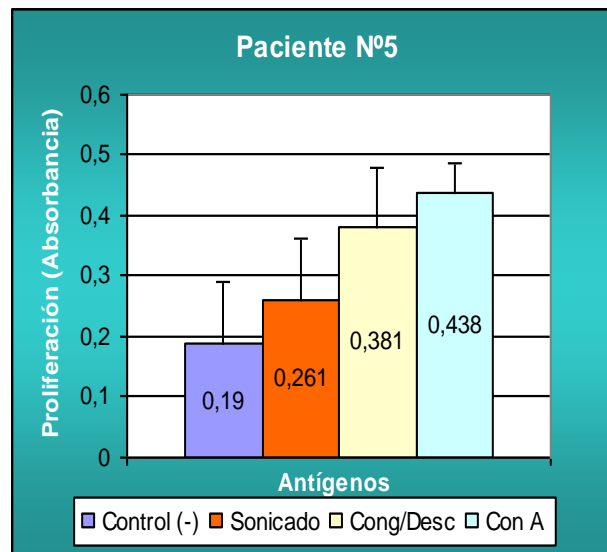
El paciente N° 4 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos extraídos del parásito cuyos valores de absorbancia son muy cercanos con relación a la media (ver Fig. 37). Se observa también un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig 37. Paciente N°4, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL**



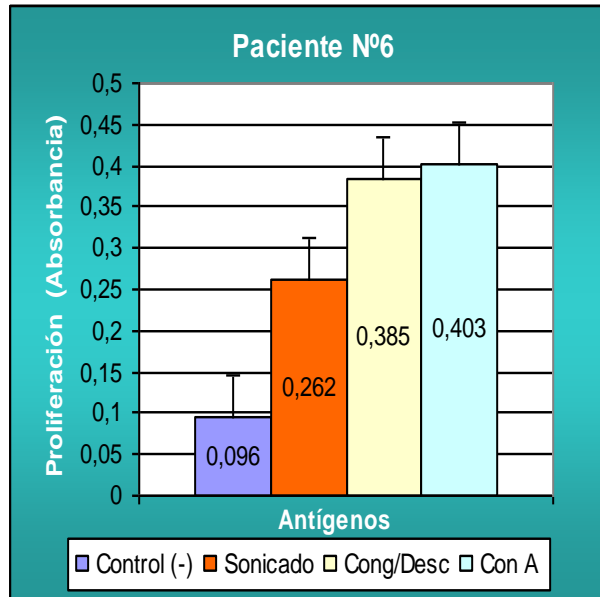
El paciente N° 5 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea presentó una respuesta linfoproliferativa alta tanto a la Con A como a los antígenos extraídos del parásito cuyos valores de absorbancia son muy cercanos con relación a la media, (Ver Fig. 38). Se observa un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig 38. Paciente N°5, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL**



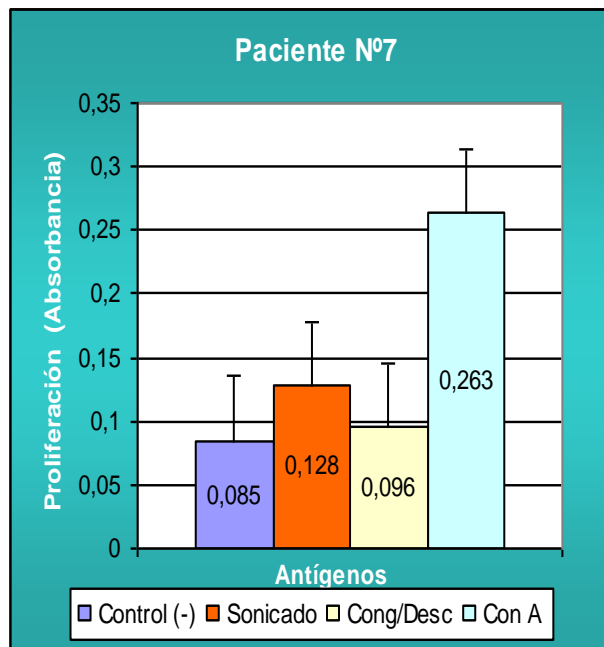
El paciente N° 6 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos con relación a la media como se muestra en la Fig. 39. Se observa también un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig 39. Paciente N°6, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL**



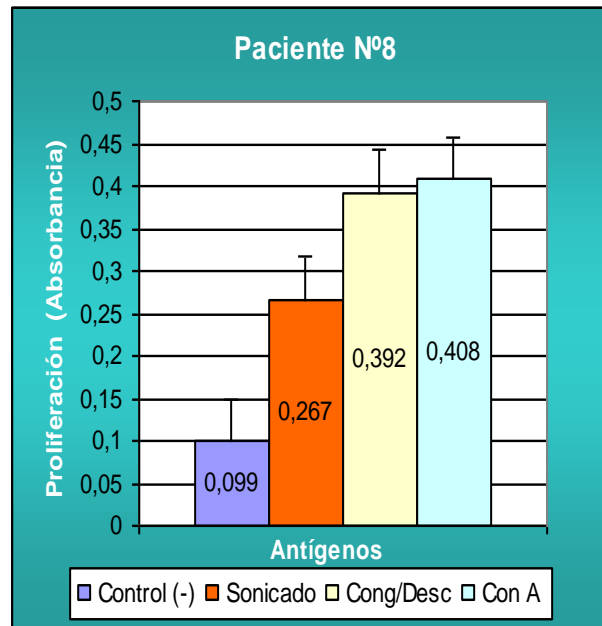
El paciente N°7 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una baja respuesta linfoproliferativa al antígeno obtenido por congelación/descongelación pero no así con el antígeno obtenido por sonicación ni hacia la Concanavalina A cuya respuesta de proliferación fue mas intensa, como se muestra en la Fig. 40. Se observa un mayor efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por sonicación que el obtenido por congelación- descongelación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig 40. Paciente N°7, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL**



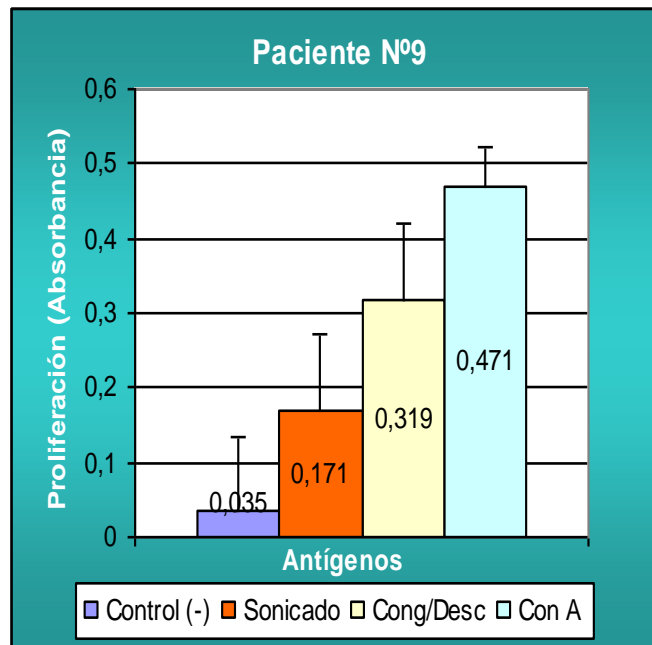
El paciente N° 8 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos con relación a la media, como se muestra en la Fig. 41. Se observa también un efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig. 41** Paciente N°8, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL



El paciente N°9 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea localizada presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos con relación a la media, como se muestra en la Fig. 42. Se observa un efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

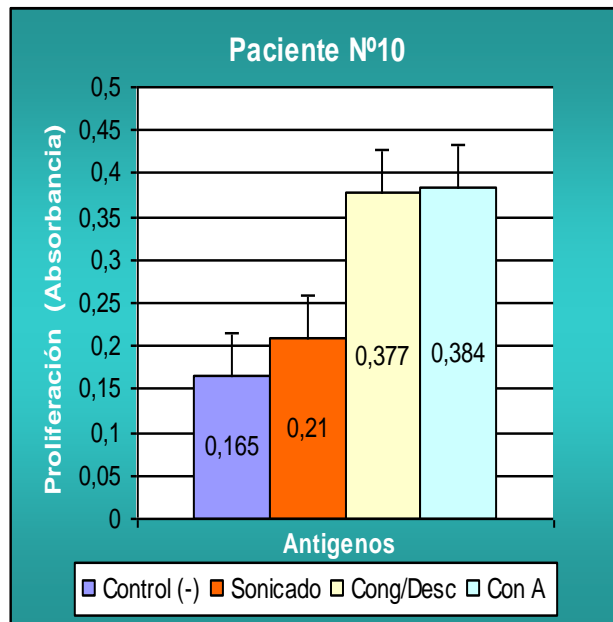
**Fig. 42** Paciente N°9, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL





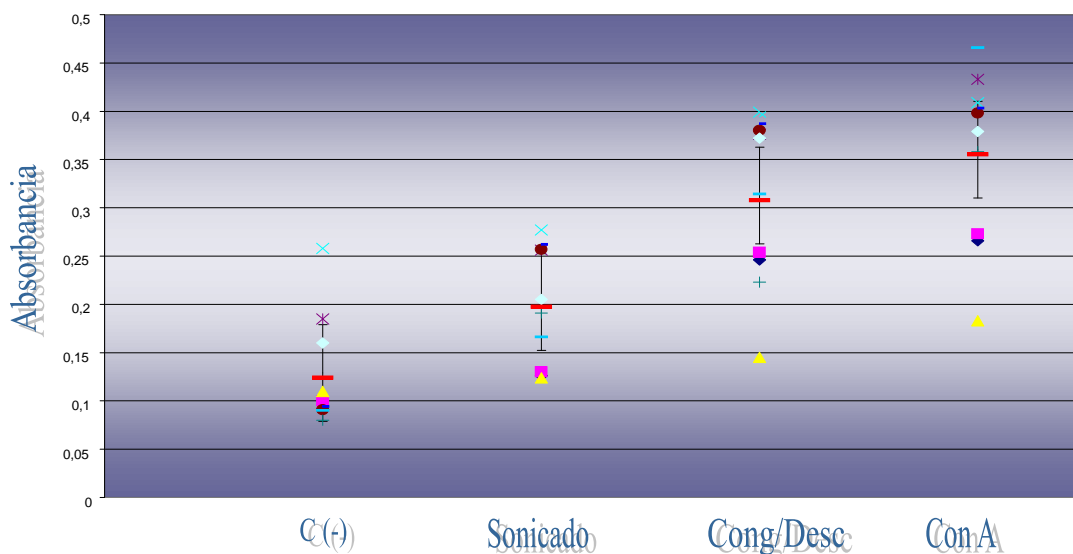
El paciente N° 10 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa alta al mitógeno Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos con relación a la media, como se muestra en la Fig. 43. Se observa también un efecto de proliferación sobre los linfocitos con el antígeno obtenido por congelación-descongelación que el obtenido por sonicación por su diferencia en las absorbancias.

**Fig.43** Paciente N°10, efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL



En la Fig.44 se muestra la gráfica de dispersión, revelando el promedio de los valores de absorbancia obtenidos por el efecto de proliferación a los diferentes estimulantes (Con A y antígenos totales preparados) utilizados en el presente estudio para el total de la población. La media del control negativo fue 0,129 por lo tanto los valores de absorbancia de las muestras experimentales fueron más altos que el control negativo indicando un aumento en la proliferación celular. La media encontrada para la ConA capaz de estimular la proliferación de linfocitos fue de 0,360 y es significativamente más alta que los antígenos totales. El antígeno total preparado por congelación – descongelación tuvo una media de 0,313 encontrándose valores de absorbancia mayores en respuesta a la proliferación celular que el antígeno total preparado por sonicación, cuyo promedio de valores de absorbancia fue 0,202.

**Fig. 44 Efecto del antígeno obtenido por congelación/descongelación y del antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL en el total de pacientes. (Grafico de dispersión).**



***DISCUSIÓN***

## X. DISCUSION

La evaluación de la respuesta inmunológica desarrollada por pacientes con Leishmaniasis cutánea y mucocutánea, fue realizada en términos de proliferación celular en cultivos in vitro, que constituyen una importante aproximación en la determinación de los mecanismos involucrados con las formas clínicas de la enfermedad.

Se aislaron los linfocitos de dichos pacientes y se evaluó la respuesta proliferativa con la prueba del MTT frente al activador policlonal Concanavalina A y a los antígenos de Leishmania preparados, encontrándose diferencias en su efecto. La respuesta proliferativa hacia el antígeno obtenido por congelación/descongelación fue mas intensa en comparación con el antígeno obtenido por sonicación en una población celular de  $5 \times 10^6$  células/mL en el total de pacientes, como se muestra en el gráfico de dispersión (Fig. 44), a su vez la Concanavalina A por su acción policlonal, tiene un mayor efecto activador frente a los antígenos preparados, en todo los casos.

El paciente N° 1 con diagnóstico de Leishmaniasis Cutánea tipo verrucosa presentó una baja respuesta linfoproliferativa al mitógeno Con A así como también a los antígenos de Leishmania como se muestra en el gráfico de dispersión (Fig. 44), presentando valores de absorbancia bajos en comparación a la media.

El registro clínico muestra un cuadro clínico de 1 año de evolución, presentando a nivel del tercio medio de la cara anterior de la pierna derecha varias úlceras de bordes infiltrados de diámetros variables, cubiertas de costras verrucosas que al levantar se observaba material purulento, al momento de la toma de muestra recibió 8 ampollas de glucantime 5.8 mL EV, el tratamiento que siguió fue de 14 ampollas de glucantime 5.8 mL EV por 20 días, aparte de las 19 ampollas que recibió sin estar internado en la unidad, paracetamol 500 mg VO, ciprofloxacina 500 mg VO cada 12 horas por 10 días,

curaciones diarias y aplicación de ciprofloxacina crema por 10 días. Su evolución fue francamente favorable.

El paciente N° 2 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea presentó una baja respuesta linfoproliferativa tanto a la Con A como a los dos antígenos extraídos del parásito, presentando valores de absorbancia bajas en comparación a la media. El registro clínico muestra un cuadro clínico de 1 año de evolución caracterizado por presentar ampollas en la cara interna del pie izquierdo, prurito y coloración violácea de dicha región, cuando se tomó la muestra el paciente, se encontraba en su quinceavo día de tratamiento, recibió glucantime IV lenta a 52 g/min. diluido en 300cc de Solución Fisiológica en 2 horas por 20 días, paracetamol 500 mg VO, ciprofloxacina 500 mg VO cada 12 horas por 10 días, curaciones diarias y aplicación de ciprofloxacina crema por 10 días. Dicho paciente presentó una evolución francamente favorable con disminución de tamaño y profundidad de las úlceras tras instauración de tratamiento con glucantime además de recibir tratamiento antibiótico.

El paciente N° 3 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una baja respuesta linfoproliferativa a la Con A y los antígenos del parásito con valores muy bajos de absorbancia con relación a la media. El registro clínico muestra un cuadro clínico de 6 años de evolución caracterizado por prurito, eritema y dolor en la nariz, en el examen físico dermatosis diseminada en región nasogeniana y mejillas con aumento de volumen y eritema intenso además de úlceras. Fue internado por presentar lesiones hiperqueratóticas erosivas en región facial. Al momento de la toma de muestra el paciente ya había recibido su quinceava dosis de anfotericina B. El tratamiento que recibió fue 26 ampollas de anfotericina B con evolución favorable, curaciones con permanganato de potasio en lesiones de la nariz y aplicación de cremas antibióticas y paracetamol 500 mg.

Los tres pacientes anteriormente citados ya sea con LC o LCM presentaron baja respuesta linfoproliferativa a Con A, cuyo tiempo de evolución de la infección fue mayor

a 1 año; en comparación con otros trabajos se obtuvieron resultados que difieren del nuestro, como por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en modelo murino, donde se cultivaron células del nódulo linfático de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. major*, frente a Con A, se observó una disminución de la proliferación en presencia de Con A al inicio de la infección, pero ésta fue recuperada en ambas cepas de ratones y persistió durante la infección ( Sadick y col.1986)<sup>(120)</sup> pero esto en modelos animales. Nuestros tres pacientes en estudio además mostraron débil respuesta de proliferación a los antígenos del parásito; en estudios con LCD y LCL (Castés y col. 1983)<sup>(106)</sup> los pacientes con LCL presentaron una moderada reactividad linfocitaria, mientras que en los pacientes con LCD fue notable la ausencia total de respuesta *in Vitro* a los antígenos de *Leishmania*.

Las células mononucleares periféricas respondieron débilmente al test de proliferación linfocitaria en presencia del estímulo específico con antígeno de *Leishmania braziliensis*. Estos resultados estarían en contradicción con estudios anteriores según los cuales la magnitud de la respuesta de células T tiende a ser mayor en pacientes con *Leishmaniasis* cutánea mucosa en comparación con pacientes con *Leishmaniasis* cutánea (Carvalho 1985, Conceicao-Silva 1990, Saravia 1989),<sup>(104,107,121)</sup> sugiriendo que pacientes con *Leishmaniasis* cutáneo mucosa presentan una exacerbada hipersensibilidad al antígeno parasitario, lo cual agravaría el cuadro clínico de estos pacientes. Sin embargo es importante destacar que estudios previos realizados por (Gaafar 1995)<sup>(111)</sup> muestran que en un porcentaje reducido de pacientes con *leishmaniasis* cutánea severa, el 30% de la respuesta linfoproliferativa es menor a la respuesta de un 80% de pacientes con *leishmaniasis* cutánea leve.

A pesar de la disminución de la capacidad proliferativa de las células de los tres primeros pacientes analizados en nuestro estudio, sugiere que en esta fase de la infección de estos pacientes y casi a la conclusión de su régimen de tratamiento, la respuesta inmune necesaria para una recuperación se traduciría, tal vez, en la producción de

citoquinas y no tanto en la multiplicación de células efectoras, también la mayoría de estos enfermos mantienen un estado nutricional deficiente, lo que puede estar relacionado con una disminución de la respuesta inmune celular que los hace a su vez susceptibles a la infección y la propia infección parasitaria puede que provoque un estado de inmunosupresión inespecífica secundario a ésta, como mecanismo de evasión del parásito frente a la respuesta inmunológica activa del hospedero. En concordancia con el reporte de otros autores que observaron una disminución de la respuesta linfoproliferativa al final de tratamiento (DaCruz 1994, Toledo 2001)<sup>(108)</sup> es probable que in vivo, el tratamiento provoque una reducción de la carga parasitaria, lo cual conduciría a un número menor de células T respondedoras.

El paciente N°4 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos extraídos del parásito cuyos valores de absorbancia son muy cercanos con relación a la media, el registro clínico muestra cuadro clínico con 4 meses de evolución con pápula en rodilla derecha la cual al ser excoriada aumentó de tamaño y se rodeó de múltiples úlceras pequeñas con secreción purulenta. Al momento de la toma de muestra el paciente se encontraba en su tercera semana de tratamiento. Recibió 300cc Solución Fisiológica más glucantime 14 cc por goteo para 3 horas por 20 días; la curación fue con permanganato de potasio, tetraciclina y cotrimoxazol. Dicho paciente presentó una evolución francamente favorable.

El paciente N° 5 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea presentó una respuesta linfoproliferativa alta tanto a la Con A como a los antígenos extraídos del parásito cuyos valores de absorbancia son muy cercanos a la media, el registro clínico muestra cuadro clínico de 9 meses de evolución caracterizado por presentar en región dorsal de mano derecha úlcera de 3 cm. de diámetro, de bordes regulares, elevados, infiltrados eritematoso con micropápula, el fondo de color marrón con presencia de tejido áspero. El tiempo de tratamiento al momento de la toma de muestra fue de 18 días. Recibió glucantime IV lenta a 52 g/min. diluido en 300cc de Solución Fisiológica en 2 horas por

30 días. Paracetamol PRN 300 mg. La evolución del paciente fue favorable, las lesiones responden al tratamiento con glucantime, disminuyendo de tamaño e inflamación.

El paciente N° 6 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos a la media, el registro clínico muestra un cuadro clínico de 5 meses de evolución de la enfermedad, donde en las fosas nasales se aprecia una erosión con algunas costras hemáticas a nivel orofaríngeo, se aprecia tejido cicatrizal en paladar superior y faríngeo posterior, edema y eritema. Su tratamiento fue 21 dosis de anfotericina B, al momento de la toma de muestra ya había recibido 15 dosis de anfotericina B. Dicho paciente presentó una evolución francamente favorable.

Resultados similares obtuvieron otros investigadores midiendo la respuesta linfoproliferativa de los pacientes con LCM, utilizando extractos obtenidos *L. braziliensis* donde los pacientes con LCM manifestaron una fuerte respuesta linfoproliferativa. (Castés y col. 1983)<sup>(106)</sup>.

El paciente N° 7 con diagnóstico de Leishmaniasis muco cutánea presentó una baja respuesta linfoproliferativa al antígeno obtenido por congelación/descongelación pero no así con el antígeno obtenido por sonicación ni hacia la Concanavalina A cuya respuesta de proliferación fue mas intensa. Dicho paciente refiere Leishmania Muco cutánea (LCM), onicomicosis, enfermedad periodontal crónica y proceso periapical crónico, con cuadro clínico de 2 años y medio de evolución, la nariz presente placa eritematosa en proceso de cicatrización y tabique nasal perforado, paladar blando y orofaríngeo con tejido de granulación, la lesión tomó todo el labio superior y ahora tiene lesión cicatrizal. El tratamiento que recibió fue dieta hiperkalemica e hipernatremia, antihistamínicos 1 hora antes de la anfotericina B, DSA 5 % 500 cc + anfotericina B 50 mg p/8h a 20 g/min (29 dosis). Al momento de la toma de muestra el paciente ya había recibido 18 dosis de



anfotericina B. Su evolución fue favorable. Dicho paciente mostró variación en la respuestas de un antígeno y el otro.

El paciente N° 8 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa favorable a la Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos a la media. El registro clínico muestra cuadro clínico de 1 año y 10 meses de evolución que se inicia con lesión eritematosa dolorosa a nivel de mucosa de fosa nasal izquierda, la cual produce erosión que va complicándose. En la región nasal izquierda se observa aumento de volumen con eritema intenso, mucosa nasal eritematosa con erosiones y costras hemáticas. A nivel de la cara interna del brazo izquierdo se aprecia cicatriz de 2 x 2 cm. de diámetro atrófica y brillante. Al momento de la toma de muestra ya había recibido 21 dosis de glucantime. El Tratamiento fue solución Fisiológica 300cc + 11.4 cc de glucantime a goteo por 2 horas, paracetamol 500 mg VO PRN. Se añadió mupirocina en crema sobre la lesión por 30 días, fué valorado por el otorrinolaringólogo al recibir la dosis 28 de glucantime, posteriormente se indicó 10 días más de tratamiento. Dicho paciente presentó una evolución francamente favorable.

El paciente N° 9 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea localizada presentó una respuesta linfoproliferativa alta a la Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos con relación a la media. En el registro clínico el paciente refiere la aparición de lesiones maculopapulares de tamaño pequeño (0.5 cm.) en el dorso de la mano izquierda hace 7 semanas, el motivo de internación es por ulcera en la mejilla y dorso de la mano izquierda. Se encontró en su tercera semana de tratamiento al momento de la toma de muestra, recibió glucantime IV lenta a 52 g/min. diluido en 300cc de Solución Fisiológica en 2 horas, el primer día 2 ampollas, el segundo día 3 ampollas, el cuarto días 2 ampollas y así sucesivamente un día 2 y otro 3 por 20 días. Las lesiones responden al tratamiento con glucantime, disminuyendo de tamaño e inflamación.

Presentó moderada intolerancia a la nitrofurantoina pero concluyó el tratamiento. La evolución del paciente fue favorable.

El paciente N° 10 con diagnóstico de Leishmaniasis cutánea mucosa presentó una respuesta linfoproliferativa alta al mitógeno Con A y a los antígenos del parásito con valores de absorbancia muy cercanos con relación a la media. El registro clínico muestra que el paciente recibió tratamiento con anfotericina B, 11 dosis pero suspendió por 2 semanas por alteración de la función renal, en el examen físico se encuentra en regular estado general sin lesiones mucosas ni cutáneas evidentes. Al momento de la toma de muestra ya había recibido 17 dosis de anfotericina B, la evolución en el hospital continuó con Anfotericina B hasta la 22 dosis y el último control de función renal muestra nuevamente alteración. La valoración por ORL indica que ya no hay lesión en tabique por lo que dicho paciente presentó una evolución francamente favorable.

Los pacientes de nuestro estudio viven en poblaciones ubicadas en la región Sud Yungas del departamento de La Paz como Palos Blancos, Chulumani; de los 10 Pacientes, 5 presentaron la forma clínica de leishmaniosis cutánea, 5 con leishmaniosis muco cutánea y un caso con leishmaniosis cutánea tipo verrucosa. El tiempo transcurrido desde la aparición de la enfermedad hasta lograr el diagnóstico correcto fue muy variable, tardaron, en general, de cuatro meses a un año los pacientes que padecían la forma cutánea, de 5 meses a 6 años los que padecían la forma muco cutánea. Las partes del cuerpo más afectadas fueron ambas extremidades y de éstas las manos. Así mismo resultaron frecuentes las localizaciones múltiples con lesiones en las mucosas (nasal, paladar, orofaringe), en la Leishmaniasis muco cutánea estuvo involucrada la mucosa nasal y oral.

De las diez muestras extraídas, 6 de ellas mostraron una alta respuesta linfoproliferativa (pacientes 4,5,6,8,9 y 10 ) al antígeno obtenido por congelación /descongelación, al antígeno obtenido por sonicación y a la Concanavalina A; 3 de las

diez muestras extraídas mostraron una baja respuesta linfoproliferativa (pacientes 1, 2 y 3) y solo el paciente 7 mostró una respuesta linfoproliferativa más intensa al antígeno obtenido por sonicación y a la ConA pero una respuesta baja de proliferación con el antígeno obtenido por congelación/descongelación.

El tratamiento que siguieron duró un mínimo de 20 y un máximo de 40 días y se usaron de 14 a 29 ampollas de droga para cada paciente. Los 10 pacientes enfermos concluyeron su tratamiento obteniendo la cura clínica, el retraso más grande estuvo en los pacientes con la forma cutánea mucosa y cutánea que interrumpieron el tratamiento por presentar remisión parcial de sintomatología y por no acudir a tiempo a un centro médico especializado.

Solo un paciente que recibió tratamiento con anfotericina B, 11 dosis suspendió por 2 semanas por alteración de la función renal. Se evidenció que el tratamiento con Glucantime y anfotericina B fue eficaz en el tratamiento de la enfermedad cuya evolución de los pacientes fue favorable, las lesiones respondieron disminuyendo de tamaño e inflamación.

El tratamiento favorece el re establecimiento de la respuesta celular, ya que provoca una reducción de la carga parasitaria, lo cual conduciría a un numero menor de células T respondedoras, es así en algunos estudios realizados, que después de concluir el tratamiento con antimoniales o pentamidina se produjo una restauración parcial o total de la proliferación linfoblástica frente al antígeno (Bourdoiseau y cols., 1997; Rhalem y cols., 1999).<sup>(100,118)</sup> Y después del tratamiento con anfotericina B también se restauró la respuesta proliferativa frente al antígeno y frente a fitohemaglutinina, (Moreno y cols., 1999)<sup>(115)</sup>, Esto también lo observaron (Guarga y cols. 2002)<sup>(112)</sup>, encontrando recuperación de la respuesta frente a fitohemaglutinina y frente al antígeno después del tratamiento con Glucantime, pero con retorno posterior a los valores previos de no-respuesta. Por lo tanto, en algunos casos existiría un alto grado de inmunosupresión que

el tratamiento no es capaz de restaurar. En estudio con modelos animales tratados con antimoniales mostraron respuesta proliferativa variable (Fernández-Pérez y cols., 2003)<sup>(110)</sup>.

La intensa respuesta linfoproliferativa hacia la Con A en pacientes con Leishmaniasis cutánea y muco cutánea (pacientes 4,5,6,8,9,10) son hallazgos coincidentes con los estudios que se realizaron en animales infectados donde se observó una alta proliferación de las células esplénicas estimuladas frente a ConA ya entre la cuarta y octava semana de la infección (Stobo, Paul, 1973)<sup>(122)</sup>, así mismo un estudio realizado por (M. Castés M. Castas 2004)<sup>(105)</sup> muestra que la respuesta proliferativa de los linfocitos frente a la PHA fueron significativamente más bajos que los de los controles (87 personas, provenientes de zonas endémicas) en LCL y LCM en particular pero con Con A las respuestas fueron, sin embargo, efectivamente altas en estos pacientes.

En ensayos de linfoproliferación celular realizados en modelos animales expuestos con *L. infantum* se produjo un descenso en la proliferación celular frente a concanavalina A y frente a los antígenos con respecto al grupo de los animales sanos, esto en animales sintomáticos (Cabral y cols., 1992; Cabral y cols., 1993; Pinelli y cols., 1994; Cabral y cols., 1998).<sup>(101,102,103,117)</sup> Según Rama 2004 se encontró variabilidad individual pero por regla general, existió una mayor respuesta linfoproliferativa en los animales infectados. Así por ejemplo, existió proliferación celular frente al antígeno de *Leishmania* en células sanguíneas de algunos animales asintomáticos, sin embargo, algunos de los animales no respondieron al antígeno, probablemente porque estuvieron inmunodeprimidos ya que sus células tampoco fueron capaces de responder a Concanavalina A (Cabral y cols., 1992)<sup>(103)</sup>. Más tarde se confirmaron esos resultados, existiendo proliferación celular frente al antígeno y frente a Concanavalina A en animales asintomáticos, aunque frente al mitógeno existió mucha variabilidad en la respuesta (Cabral y cols., 1993, Cabral y cols., 1998)<sup>(101,102)</sup>. También observaron proliferación frente al antígeno y a Concanavalina A en las células sanguíneas de animales

asintomáticos, con inhibición de la proliferación antígeno-específica en los animales sintomáticos. Sin embargo, estos últimos animales también presentaron respuesta celular frente a concanavalina A de forma similar a la de los animales sanos y asintomáticos (Pinelli y cols., 1994)<sup>(117)</sup>.

Estos resultados no concuerdan con los de De Luna y cols.<sup>(109)</sup>, ya que estos autores observaron inhibición de la proliferación celular frente a antígenos y mitógenos (concanavalina A, fitohemaglutinina) en animales sintomáticos infectados naturalmente, demostrándose que dicha inhibición se producía desde estadios tempranos de la infección.

La respuesta linfoproliferativa utilizando los extractos del parásito *L. Braziliensis* obtenidos por sonicación y el proceso de congelación/descongelación manifestaron una fuerte respuesta de proliferación en los linfocitos de pacientes tanto con *Leishmania* cutánea como los pacientes con *Leishmania* muco cutánea (pacientes 4,5,6,8,9,10) coincidiendo con los resultados obtenidos por (M. Castés 2004)<sup>(105)</sup> donde *tanto in vivo como in vitro* la respuesta inmune celular a los antígenos de *Leishmania* fueron significativamente mayores en pacientes con LCM y LCL pero, la intensidad de las reacciones, son mucho mayores en LCM y que pacientes con LCD, demostrando una ausencia total de respuesta inmune específica tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios en ratones realizados por Sadick y col<sup>(110)</sup> son también comparables con nuestro estudio, donde se observó un aumento de la proliferación al inicio de la infección, pero a la tercera semana se observó una marcada disminución de la respuesta y volvió a recuperarse aproximadamente a partir de la sexta semana de la infección, la cepa que utilizaron fue *L. major*.

Estudios previos (Castés, M. 1996)<sup>(105)</sup> demostraron que pacientes con LCL presentan respuestas proliferativas frente a los antígenos de *Leishmania*. Además se observó un aumento significativo en la expresión del receptor para la IL-2 y producción de INF- $\gamma$ , luego de exposición de células mononucleares tanto al antígeno de *Leishmania*, como a la

PHA. Sin embargo, estas respuestas aunque positivas, fueron significativamente menores que en los pacientes con LCM. Dichos resultados sugieren que los pacientes con LCL se caracterizan por un patrón de citoquinas tipo Th1 en el comportamiento sanguíneo, tal y como ha sido demostrado para las formas curativas en el modelo experimental murino. En los pacientes con LCM demostramos una fuerte respuesta linfoproliferativa frente al antígeno de Leishmania, y un aumento significativo de los receptores para la IL-2, el cual fué mucho mayor en la células mononucleares estimuladas con antígeno leishmánico que con PHA.

En un estudio realizado utilizando antígenos totales y fracciones solubles (M Liscano, Z Longa 2010 ) la mayor proliferación se detectó con el antígeno total. Este hallazgo, resulta lógico si consideramos la multiplicidad antigénica presente en el antígeno total del parásito, comparado con las fracciones utilizadas que sólo contienen uno o pocos péptidos. También se demostró que la cantidad de péptido antigénico necesario para disparar respuestas de proliferación, puede ser tan baja como 0.5 µg/mL, en comparación con los ensayos con el antígeno soluble (5–20 µg/mL). En contraste con dicho estudio la cantidad que utilizamos para activar la respuesta de proliferación fue de 12,5 ug/mL para cada antígeno.

La respuesta linfoproliferativa de linfocitos provenientes de los pacientes en estudio que presentaron Leishmania cutánea y Leishmania cutánea mucosa es diferente, esto puede estar relacionado a la cepa de Leishmania infectante, al medio ambiente y a la respuesta inmune del hospedero. Similares estudios realizados por otros autores muestran que las células proliferaron después de la estimulación con el antígeno de Leishmania y que la frecuencia de tales células varía entre individuos.(Kemp, Morten1992)<sup>(114)</sup> pero también demostraron que, el extracto crudo de Leishmania puede inducir proliferación en células mononucleares de sangre periférica en individuos sin ser expuestos a parásitos de leishmania.

## DISCUSION

En nuestro estudio resaltamos las variantes clínicas que demuestran presencia de lesiones mixtas de leishmaniasis, mostrándose así la diversidad de formas clínicas cutáneas y mucosas que puede presentar cada paciente, así como su respuesta inmune, concluyendo que la intensidad en la respuesta proliferativa de las células T a los mitógenos específicamente a la ConA, así como también a nuestros extractos del parásito sugieren un defecto tal vez inmunológico (inmunosupresión), ya que los mitógenos estimulan significativamente a los linfocitos.

**CONCLUSIÓN**



## XI. CONCLUSION

- Se evaluó la proliferación celular de linfocitos provenientes de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea, a través del método MTT, frente a antígenos de leishmania *in vitro*, donde sugerimos que ambos antígenos tiene un efecto sobre las células del sistema inmune y que el antígeno preparado por congelación – descongelación tiene una efecto mayor en comparación con el obtenido por sonicación.
- Se optimizó técnicas de obtención de antígenos de *Leishmania braziliensis in vitro*, a través del proceso de lisis celular por diferentes métodos (sonicación y congelación/descongelación).
- Tanto en LCM y LC de los pacientes en estudio, la respuesta linfoproliferativa presento una intensidad variable sugiriendo como causas la respuesta inmune del hospedero, el tiempo de tratamiento o la cepa de *Leishmania* infectante.



**RECOMENDACIONES**

## **XII. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar experimentos de purificación de antígenos y conocer a las proteínas responsables de la actividad.
- Realizar el ensayo de proliferación celular con linfocitos de donadores sanos frente a estimuladores, para ver algún tipo de respuesta de reacción cruzada.
- Realizar el ensayo de proliferación celular con linfocitos de pacientes que presenten lesiones mucosas activas y que no hayan recibido tratamiento.
- Realizar el ensayo de proliferación celular con linfocitos de pacientes con diagnóstico de Leishmaniasis visceral.



***BIBLIOGRAFIA***

**XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. AMATO V., F. ANDRADE JR, and M.I. DUARTE. 2003 Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta tropica*. 85:39-49.
2. ASHFORD R.W., DESJEUX P., RAADT P., 1992; Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitology Today*, **8**, 3, 104-105.
3. ALRAJHIA Ibrahim, De Vol EB, et al. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 2002;346:891-995.
4. AMPUERO J. S. Leishmaniasis. Ministerio de Salud Perú, INS, 2000;39-50.
5. BONFANTE R, BARRUELA S. Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002
6. BALCAZAR Juan Manuel, 1.956. Historia de la Medicina en Bolivia, Ediciones Juventud, La Paz Bolivia.
7. BOURREAU E, PRÉVOT G, PRADINAUD R, et al. Interleukin (IL)-13 is the predominant cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and render specific CD4 + T cells unresponsive. *J Infect Dis*. 2001;183:953-9.
8. CHÁVEZ MA, SÁENZ EM. Estudio clínico epidemiológico de la leishmaniasis en el Hospital Militar Central. 1997-2000. Tesis para obtener Título de Segunda Especialización en Dermatología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina. Lima. 2002:1-60.
9. CHILDS GE, FOSTER KL, Mc ROBERTS MJ. Insect cell culture media for the cultivation of New World *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 1978;8:255-8.
10. CUBA CA, LLANOS-CUENTAS EA, et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Tres Bracos, Bahía. Brasil, an area of *Leishmania brasiliensis*

- brasiliensis.1. Laboratorio diagnosis. Rev Soc Brasil Med Trop. 1984; 17:161-167.
11. CUBA CA. Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. Rev Med Exp. 2000;17:39-51.
  12. DESJEUX, P.; S. MOLLINEDO, F. LE PONT, A. PAREDES AND G. UGARTE, 1.987, Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department) Isolation and isoenzyme characterization of 26 strains of *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 81, 742-746.
  13. DESJEUX P.; ARANDA E.; ALIAGA O.; MOLLINEDO S.; 1.983; "Human visceral Leishmaniasis in Bolivia; First proven autochthonous case from los Yungas"; Trans. R. Soc. Med. Trop.Hyg.; 77 (6) p: 851-852.
  14. DE ARRUDA W.; DA COSTA F.; NAHAS S.; ROSENFELD G. Leishmaniose Visceral Americana: constatacao de dois casos; Brasil Med. 63, 8-9
  15. DELGADO, O., FELICIANGELI M.M., GOMEZ, B., ALVARADO, J., GARCIA, L., BELLO, C., 1.998. The re-emergence of American Visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela: present situation of human and canine infections, Parasite, Dec.
  16. DIAZ NL, ZERPA O, PONCE LV. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. Exp Dermatol 2002;11:34-41.
  17. DE GOPUGUI MR, RUIZ R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. Int J Dermatol 2003: 37:801-14.
  18. DIMIER David L, DAVID C, REVISSE P, et al. Parasitological diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in Bolivia. Rev Soc Brasil Med Trop. 1991; 24:231-234.

19. DOMINGUEZ, M.I. MORENO, M. LOPEZ Trascasa and A.. TORAÑO. 2002. Complement interaction with Trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *Journal Experimental Medicine*. 195:451-459.
20. Epidemiologia. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. 1996. Epidemiologia y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio.
21. ESTEVE P., GUERRET P., RAVISSE L, DIMIER David, J.P. DEDER and J.A. GRIMAUD. 1994. Immunohistochemical analysis of the mucosal lesion in mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite*. 1: 305-309.
22. EVANS DA. Leishmania. In vitro methods for parasite cultivation. New York: Taylor AER& Baker Jr Eds. Academic Press. 1987:52-75.
23. FARAH F, KLAUS N, FRANKEBURGS, et al. Infecciones por Protozoarios y Helminthos. En: Fitzpatrick T. Dermatología en Medicina General. Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana. 1999; 3:2767-2777.
24. GRIMALDI G, TESH R, MCMAHOM-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop*.
25. GREVELINK S, LERNER E. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:257-70.
26. GARRET AILLON Jorge (1.983), La espundia en Bolivia, observaciones del Dr. Manuel Antonio Vaca Diez. Comentario Histórico. *Boletin Informativo de CENETROP*. IX, 1-5.
27. HALL LR, TITUS RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production. *J Immunol* 1995; 155:3501-6.
28. HALL BF, GRAMICCIA M, GRADONI L, et al. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. *Parasitol Today*, 1991;12: A22-A27.
29. HELBURN NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*. 2000; 25:363-70.

30. HAIDAR NA, DIAB ABL, EL-SHEIKH AM. Visceral leishmaniasis in children in the Yemen. *Saudi Med J.* 2001; 22:516-519.
31. HARTL, G., DESJEUX, P., 1998. Dramatic upsurge in visceral Leishmaniasis cases in the horn of Africa, Press Release WHO/23.
32. HIRONORI O, CHIHIRO M, KUMIKO I, et al. A case of mucosal leishmaniasis: beneficial usage of polymerase chain reaction for diagnosis. *Int J Dermatol.* 2001; 40:765-7.
33. HENDRICKS LD, WRIGHT N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's *Drosophila* medium. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28:962-4.
34. HEPBURN NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:363-70
35. JIANG H, CHESS L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004. 114:1198-1208.
36. KHARAZMI A., K. KEMP, A. ISMAIL, S. GASIM, A. GAAFAR, J.A. KURTZHALS, A. M. EL HASSAN, T. G. THEANDER, M. KEMP. 1999. T-cell response in human leishmaniasis *Immunology Letters.* 65:105.
37. KOLDE G, LUGER T, SORG C, et al. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis using systemic interferon-gamma. *Dermatology.* 1996; 192 : 56-60.
38. LE PONT Francois; 1990. Les Phlébotomes et les Leishmanioses en Bolivie; These de Doctorat de l'Université de Paris Sud; France.
39. LE PONT F.; MOUCHET J.; DESJEUX P. 1990. Distribution géographique et écologique des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) Anttrophophiles de Bolivie, sur un transect Andes-Amazonie; *Annl. Soc. ent. Fr.* 26, (2): 159-171.
40. LE PONT F. & DESJEUX P.; 1985; Leishmaniasis in Bolivia I: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector of visceral leishmaniasis in los Yungas; *Transactions of the Society of Tropical medicine and Hygiene.* 79; 227-231.



41. LLANOS-CUENTAS EA. Estudio clínico evolutivo da Leishmanose em área endêmica de *Leishmania braziliensis braziliensis*. Tres Bracos, Bahía, Brasil. Tese Mestrado. Universidade de Brasilia. Brasil. 11984; 166
42. LAINSON R, SHAW JJ. Some problems in studies on parasites of the *Leishmania braziliensis* complex. In ecologie des leishmanias. Colloques Internationaux au CNRS. 239 Montpellier. 1967:83-86.
43. LE PONT Francois; 1990. Les Phlébotomes et les Leishmanioses en Bolivie; These de Doctorat de l'Université de Paris Sud; France.
44. LUCAS CM, FRANKE ED, CACHAY MI, et al. *Leishmania (viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. Am J Trop Med Hyg. 1994; 51:533-7.
45. LEÓN LA. Formas clínicas de la leishmaniasis tegumentaria americana. Rev Medi Mex 1973;53:17-23.
46. LE PONT F. & DESJEUX P.; 1986; Leishmaniasis in Bolivia II. The involvement of *Psychodopygus yucumensis* and *Psychodopygus llanos martinsi* in the selvatic transmission cycle of *Leishmania braziliensis braziliensis* in a lowland subandean region; Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 81(3): 311-318.
47. LAINSON R, SHAW J, SILVEIRA F, DE SOUZA A, BRAGA R, ISHIKAWA E. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1994; 89: 435-43.
48. LAINSON R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1997; 92: 377-387.
49. LÓPEZ M, MONTOYA Y, ARANA M, et al. The use of nonradioactive DNA probes for the characterization of leishmania isolates from Peru. Am J Trop Med Hyg. 1988. 38:308-14
50. MINISTERIO DE SALUD. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección de Programa de Control de Enfermedades Transmisibles. Control de

- Malaria y OEM. Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de Leishmaniosis en el Perú. Lima 1995:1-66.
51. MINISTERIO DE SALUD. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Perú. 2000:08-83.
  52. MARTINEZ, E. F. LE PONT, S. MOLLINEDO AND E. CUPOLILLO. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia ; in press.
  53. MINISTERIO DE SALUD Y PREVISIÓN SOCIAL - Dirección General de Epidemiología. Dr. Alejandro Sánchez Bustamante. Anuario epidemiológico. Bolivia. 2000. 75-79.
  54. MOLLINEDO Sergio; HOLGUIN, E., CHAVEZ, T., SELAEZ, H., DELGADO, W., Leishmanias en Bolivia: XII. Nuevo foco de Leishmaniasis en Bermejo (Tarija) frontera con la Argentina, Comunicación preliminar, sometido a publicación. *endémicas de Bolivia; Parasitología al día* 16: 11-120.
  55. MOLLINEDO S.; DESJEUX P.; LE PONT F.; 1.984; *American Leishmaniasis*; Shell International petroleum maatschappij B.V.; Netherlands.
  56. MINISTERIO DE SALUD DE BRASIL. Fundación Nacional de Salud. Leishmaniasis tegumentaria americana en el Brasil. Cuaderno Informativo destinado a los trabajadores de salud. Brasil. 1996.
  57. MINISTERIO DE SALUD DE BRASIL. Fundación Nacional de Salud. Guía de control de la leishmaniasis tegumentaria americana. Brasil. 1991.34. World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. Leishmaniasis control home page [www:Who.int/health-topic/leishmaniasis.htm](http://www.who.int/health-topic/leishmaniasis.htm)
  58. MOLLINEDO S.; DESJEUX P.; LE PONT F.; 1.984; *American Leishmaniasis*; Shell International petroleum maatschappij B.V.; Netherlands.
  59. MOLLINEDO Sergio; HOLGUIN, E., CHAVEZ, T., SELAEZ, H., DELGADO, W., "Leishmanias en Bolivia: XII. Nuevo foco de Leishmaniasis en Bermejo (Tarija) frontera con la Argentina, Comunicación preliminar, sometido a publicación.

60. MARTINEZ E.; LE PONT F.; TORREZ M.; TELLERIA J.; VARGAS F., MUÑOZ M.; DE DONCKER S.; DUJARDIN J.C.; DUJARDIN J.P.; 1.998; A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a Sub Andean region of Bolivia; *Acta Trópica*. 71 97-106.
61. MATTE C, OLIVER M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: Modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis*. 2002;185:673-81.
62. MOLL H, BERBERICH Ch. Dendritic cell-based vaccination strategies: Induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunol*. 2001. 204:659-66.
63. MONTEIRO DE BARROSO. Leishmaniose visceral americana: Um caso de Bolivia; *Revista Clínica de Sao Paulo* ; Volumen XI, Abril, N° 4; 91-99.
64. MUJTABA G. WEEKLY. Fortnightly intralesional meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1999. 38:607-9.
65. MORIEARTY PL, GRIMALDI G. Host and parasite factors influencing outcome of *Leishmania mexicana mexicana* infection in mice. VIII Reuniao annual de pesquisa básica em doenca de chagas. Caxambú. Brazil. 1980:1-44
66. MARSDEN PD. Mucosal leishmaniasis *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80: 859-76.
67. MALTEZOU HC, SIAFAS C, MAVRIKOU M, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis*. 2000;31:1139-43.
68. MURRAY, H. W., C. MONTELIBANO, R. PETERSON AND J. P. SYPEK. 2000. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of infectious Diseases*. 182: 1497-1502.
69. NEYRA D. Las leishmaniasis en el Perú. *Folia Dermatol Peru*. 1997; 8:51-5
70. NOVIS P, ALMEIDA RP, BACELLAR O, et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infec Dis*. 1999. 180:1731-4.

71. OMS. "Lutte contre les Leishmanioses", rapport d'un Comite d'experts: 793; Geneve; 1.990.
72. OLIVEIRA-NETO MP, MATTOS M, PIRMEZ C, et al. Mucosal leishmaniasis (Espundia) responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2000;42: 321-5.
73. PEARSON R, QUEIROZ SOUZA A. Especies de Leishmania: Leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa. En: Mandell, Douglas, Benett. *Enfermedades infecciosas, principios y practica*. 4ta ed. Buenos Aires: Panamericana Ed, 1997:2724-35.
74. PEARSON RD, De QUIROZ SOUSA A. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infec Dis*. 1996;22:1-13.
75. PESCE H. *Tropicales: Leishmaniasis tegumentaria*. Separatas.1995; 1-13.
76. PRADO BARRIENTOS L. Um caso atipico de Leishmaniose cutaneo-mucosa (Espundia). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 46, 415-418.
77. PRADO BARRIENTOS L. Un caso de leishmaniosis cutaneo-mucosa con predominio de leishmanides cutáneas. *Boletin de la Agrupación Médica de estudios*, 249-257.
78. PALMER RA, TRAN D, HEPBURN NC, et al. The management of cutaneous leishmaniasis from Belize. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26:16-20.
79. ROBERTS LJ, HADMAN E, FOOTE SJ. Leishmaniasis. *Br Med J*. 2000; 321:801-4.
80. RODRIGUES MLO, COSTA RS, SOUZA CS, et al. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate /glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1999; 41:33-7.
81. RONDÓN AJ. Leishmaniasis tegumentaria americana. En: Rondón Lugo AJ. *Temas Dermatológicos. Pautas diagnósticas y terapéuticas*. Caracas:Tipografía Olímpica CA. 2001:262-9.

82. SÁNCHEZ L, SÁENZ E, CHÁVEZ M. Leishmaniasis en el Perú. En: Sociedad Peruana de Dermatología: Infectología y Piel. Lima: Mad Corp Editores e Impresores, 2000 : 201-7.
83. SMITH AR, CONNOR MP, BEER TW, et al. The use of polymerase chain reaction in New world cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 1998; 139: 539-40.
84. SANGUEZA OP, SANGUEZA MI, et al. Mucocutaneous leishmaniasis. A clinicopathology classification. *J Am Acad Dermatol.* 1993; 28:297.
85. SALAZAR M, CASTRO E. Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997-1999. *Dermatol Per.* 2001; 11:21-25.
86. SALINAS GL, VALDERRAMA G, PALMA G, y col. Detección de amastigotes en leishmaniasis cutánea y mucocutánea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con métodos convencionales de diagnóstico. *Mem Oswaldo Cruz.* 1989; 84:53-60.
87. TEJADA A. Leishmaniasis tegumentaria en el Perú. Investigación epidemiológica-clínica de la leishmaniasis tegumentaria en Cusco y Madre de Dios. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1973.
88. TREMBLAY M, OLIVER M, BERNIER R. Leishmania and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today.* 1996; 12:257-61.
89. TERABE, M., T. Kuramochi, M. Ito, T. Hatabu, C. Sanjoba, K-P. Chang, T. Onodera and Y. Matsumoto. 2000. CD4 cell are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity.* 68: 4574-4577.
90. TORREZ, M., LOPEZ, M., LE PONT, F., MARTINEZ, E., MUÑOZ, M., HERVAS, D., YAKSIC, N., AREVALO, J., SOSSA, D., DEDET, J.P., DUJARDIN, J.P. 1998, *Lutzomyia nunestovari anglesi* (Diptera Psychodidae)

as a probable vector of *Leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia. *Acta Trópica* 71, 311-316.

91. URJEL, R. & CARDOZO, L. Comunicación personal; Santa Cruz, Bolivia; 1.996
92. VIDYASHANKAR C, NOEL GJ. Leishmaniasis. *eMedicine Journal*. 2002; 3:1-19
93. VIEIRA, J.B., LACERDA, M.M., MARDSEN, P.D.; 1990; National Reporting of Leishmaniasis: The Brazilian Experience; *Parasitology Today*. Vol. 6, N° 10. 339-340.
94. VELASCO J.E. The phlebotomine sandflies of the los Yungas region of Bolivia M.S. Thesis, Louisiana State University, Department of Tropical Medicine and Parasitology, 204 p.
95. WALTON BC, SHAW JJ, LAINSON R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania brasiliensis*. *J Parasitol*. 1977;63:1118-9.
96. WEEDON D, STRUTTON G. Infecciones por protozoarios. En: Weedon, *Piel Patología* Ed. Madrid: Original Marban libros S.L. 2002: 2:605-610.
97. [www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm](http://www.iqb.es/infección/leishmaniosis.htm)
98. ZWINGENBERGER K.G., HARMS C., PEDROSA S., OMENA B., SANDKAMP S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon – gamma production. *Clinical immunology Immunopathology*. 1990. 57: 242.
99. AGUDELO, Sonia del Pilar. ROBLEDO, R. Sara, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. *IATREIA/VOL 13/No.3/ SEPTIEMBRE / 2000*
100. BOURDOISEAU G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-André I, Chabanne L. 1997. Lymphocyte subsets abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56: 345-351.
101. CABRAL M, Mcnerney R, Gomes S, O’Grady J, Frame I, Sousa JC, Miles MA, Alexander J. 1993. Demonstration of natural *Leishmania* infection in

- asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 70: 473-479.
- 102.** CABRAL M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 76: 173-180.
  - 103.** CABRAL M, O'Grady JO, Alexander J. 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, 14: 531-539.
  - 104.** CARVALHO, E.M., JOHNSON, W., BARRETO, E., ROCHA, H.1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 135: 4144-4148.
  - 105.** CASTES, M., AGNELLI and RONDON, A. 2004. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clinical immunology and Immunopathology*. 27:176-186.
  - 106.** CASTES, M., AGNELLI, O. and RONDON, J. 1983. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 27:176-186.
  - 107.** CONCEICAO-SILVA, F., DOREA, C., COUTINHO, G. 1990. Quantitative study of *Leishmania braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american mucocutaneous leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology*. 79:221-226.
  - 108.** Da-CRUZ, A., CONCEICAO-SILVA, F. 1994. *Leishmania*-reactive CD4 and CD8 T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 62: 2614-2618.
  - 109.** DE LUNA R, Vuotto ML, Ielpo MTL, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70: 95-103.

110. FERNÁNDEZ-Pérez FJ, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM. 2003. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Tropica*, 86: 83-91.
111. GAAFAR, A., KHARAZMI, A., THEANDER, G. 1995. Dichotomy of T cell response to leishmania antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis: absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clinical Experimental of Immunology*. 100:239-245.
112. GUARGA JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribañez MA, Castillo JA. 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88: 13-20.
113. HERNÁNDEZ, Joselin. CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. Méx vol.48 no.5 Cuernavaca Sep./Oct. 2006
114. KEMP M, Kurtzhals JAL, Bendtzen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koech DK, Kharazmi A, Theander TG. 1993. *Leishmania donovani*-reactive Th1 and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 61: 1069-1073.
115. MORENO J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barker DC, Alvar J. 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after chemotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71: 181-195.
116. MOURA, T.R., F.O. Novais, F. OLIVEIRA, J. CLARENCIO, A. NORONHA, A. BARRA, C. BRODSKYN and C.I. de OLIVEIRA. 2005. Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*. 73:5827-5834.
117. PINELLI E, Killick-Kendrick R, Wagenhaar J, Bernardina W, del Real G, Ruitenber J. 1994. Cellular and Humoral immune responses in dogs



- experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 62: 229-235.
- 118.** RHALEM A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 81: 173-184.
- 119.** SADICK, M., LOCKSLEY, R. 1986. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon in response to leishmania antigens in vitro. *J. Immunol.* 136:655-661.
- 120.** SADICK, MD., HEINZEL, B.J. DAWKINS and LOCKSLEY, R.M. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma independent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*. 171:115-127.
- 121.** SARAVIA, N. G., VALDERRAMA, L., LABRADA, M. 1989. The relationship of leishmania braziliensis subspecies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis. *Journal Infection and diseases*. 159: 725-735.
- 122.** STOBO, J. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as probes for T cell subsets. *J. Immunol.* 110:362-375. 1973.

## ANEXO # 1

TABLA II

TAXONOMIA DE *LEISHMANIA*.

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| <b>REINO</b>     | PROTISTA          |
| <b>SUBREINO</b>  | PROTOZOA          |
| <b>PHYLUM</b>    | SARCOMASTIGOPHORA |
| <b>SUBPHYLUM</b> | MASTIGOPHORA      |
| <b>CLASE</b>     | ZOOMASTIGOPHORA   |
| <b>ORDEN</b>     | KINETOPLASTIDA    |
| <b>SUBORDEN</b>  | TRYPANOSOMATINA   |
| <b>FAMILIA</b>   | TRYPANOSOMATIDAE  |
| <b>GÉNERO</b>    | <i>Leishmania</i> |

Filogenia del género *Leishmania*. Fuente Gonzales et al. 2004

## **ANEXO # 2**

### **PREPARACION DE PBS Buffer**

**PBS Buffer de fosfatos 0,15 M, pH 7.4 (para 1 L)**

- 1). 8 g NaCl
- 2). 0.2 g KCl
- 3). 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 4). 0.20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 5). 800 mL agua Destilada
- 6). Ajustar pH a 7.4 con HCl
- 7). Aforar a 1 L.

Nota: Conservar a 4-8 °C

Es estable por tres o más meses.

Desechar si aparecen cambios de coloración o precipitados.