



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS**



LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPOSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADEMICOS.

LICENCIA DE USO

El usuario está autorizado a:

- a) visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la referencia correspondiente respetando normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADOS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES FACULTAD DE
CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS CARRERA DE
BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



DETERMINACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE LOS NIVELES DE
ANTICUERPOS IgG e IgE ANTI - *LEISHMANIA* COMO RESPUESTA AL
TRATAMIENTO ANTI - *LEISHMANIA*

ELABORADO POR:

Univ. GANINNA GLORY MONTAÑO CASTAÑÓN

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ - BOLIVIA

2013



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES FACULTAD DE
CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS CARRERA DE
BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACION EN SALUD (SELADIS)**



**DETERMINACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE LOS NIVELES DE
ANTICUERPOS IgG e IgE ANTI - *LEISHMANIA* COMO RESPUESTA AL
TRATAMIENTO ANTI - *LEISHMANIA***

ELABORADO POR:

Univ. GANINNA GLORY MONTAÑO CASTAÑÓN

ASESOR:

Dr. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

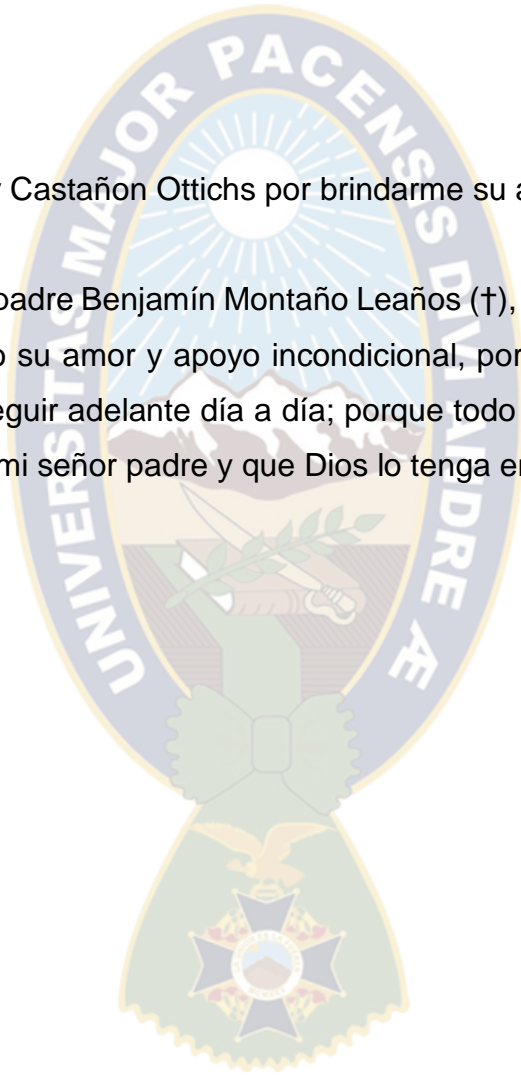
LA PAZ - BOLIVIA

2013

DEDICATORIA

A mi madre Glory Castañon Ottichs por brindarme su apoyo y por creer en mí.

En especial a mi padre Benjamín Montaña Leños (†), por creer en mí, ayudarme a crecer con todo su amor y apoyo incondicional, por haberme dado la energía suficiente para seguir adelante día a día; porque todo lo que tengo y todo lo que soy se lo debo a mi señor padre y que Dios lo tenga en su santa gloria.



CONTENIDO

CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
A. Epidemiología.....	3
1. Patrón epidemiológico 1.....	4
2. Patrón epidemiológico 2.....	4
B. Leishmaniasis.....	7
1. Vector.....	7
2. Ciclo de vida del vector.....	7
3. Formas morfológicas.....	9
C. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	11
D. Ciclo Biológico.....	12
E. Tipos de Leishmaniasis.....	13

1.	Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL).....	14
a.	Primer estadio de la úlcera primaria (Lesión cutánea)	14
b.	Segundo estadio con lesiones cicatrízales.....	15
2.	Leishmaniasis Cutaneomucosa (LCM).....	16
a.	Tercer estadio, úlceras secundarias (Lesiones mucosas).....	16
3.	Leishmaniasis Visceral (LV).....	17
F.	Fisiopatología de la enfermedad.....	18
G.	Aspectos inmunológicos.....	20
1.	Los parásitos inducen la expresión específica e inespecífica de anticuerpos.....	20
2.	Cambio de isotipo a IgE.....	21
3.	Papel de los mastocitos y eosinófilos en la expulsión de los parásitos.....	22
4.	Interrelación inmune entre eosinófilos y mastocitos.....	24
5.	Aspectos inmunológicos de la piel.....	29
6.	Inmunidad humoral frente a leishmaniasis.....	30
a.	La Inmunoglobulina E (IgE).....	30
b.	La inmunoglobulina G (IgG).....	33

H.	Diagnóstico.....	35
1.	Métodos directos o parasitológicos.....	36
a.	Frotis de lesión.....	36
b.	Cultivo de parásitos.....	37
i.	Aislamiento primario de las lesiones cutáneas...	38
ii.	Aislamiento primario de las lesiones mucosas...	38
c.	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	39
d.	Real Time PCR.....	40
e.	Citometría de Flujo.....	42
2.	Métodos Inmunológicos.....	43
a.	Intradermorreacción de Montenegro.....	44
b.	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	44
c.	Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	45
I.	Tratamiento.....	46
1.	Atención curativa de la Leishmaniasis.....	47
a.	Administración del tratamiento.....	48
b.	Medidas generales.....	48
c.	Procedimientos previos al tratamiento.....	49
i.	Efectos secundarios al tratamiento Leishmanicida.....	

	50
ii. En caso de sobredosis.....	50
2. Antimoniales pentavalentes.....	52
a. Mecanismo de acción.....	52
b. Farmacocinética.....	53
c. Anfotericina “B”.....	53
3. Evanta.....	55
III. ANTECEDENTES.....	56
IV. JUSTIFICACIÓN.....	58
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	59
VI. OBJETIVOS.....	60
A. Objetivo General.....	60
B. Objetivos Específicos.....	60
VII. DISEÑO METODOLÓGICO.....	61
A. Tipo de estudio.....	61
B. Población en estudio.....	61
C. Descripción de la muestra.....	61
1. Tamaño de la muestra.....	61
a. Grupo Nº 1.....	61

b.	Grupo N° 2.....	62
c.	Criterios de inclusión para el grupo N° 1.....	62
d.	Criterios de inclusión para el grupo N° 2.....	62
e.	Criterios de exclusión para los grupos 1 y 2.....	62
2.	Suero Control Positivo.....	63
3.	Suero Control Negativo.....	63
D.	Análisis de las muestras.....	63
1.	Pacientes tratados con Evanta.....	64
2.	Pacientes tratados con Glucantime.....	64
3.	Pacientes tratados con Anfotericina “B”.....	65
E.	Aspectos éticos.....	66
VIII.	CONTEXTO Y LUGAR.....	67
A.	Métodos.....	67
1.	Cultivo de parásitos.....	67
2.	Preparación de las placas de microtitulación de ELISA con ASL.....	68
3.	Determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgE-anti <i>Leishmania</i> en los pacientes en estudio.....	69

a.	Realización de la técnica de ELISA indirecto para medir niveles de Anticuerpos IgG anti- <i>Leishmania</i>	69
i.	Preparación del conjugado anti IgG humano conjugado con peroxidasa.....	70
ii.	Preparación del sustrato.....	70
b.	Realización de la técnica de ELISA indirecto para medir niveles de Anticuerpos IgE anti- <i>Leishmania</i>	71
c.	Preparación de improntas para Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	72
d.	Realización de IFI para medir títulos de Anticuerpos anti- <i>Leishmania</i>	73
B.	Interpretación de resultados.....	74
1.	Determinación de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> IgE e IgG por ELISA indirecto.....	74
2.	Anticuerpos contra <i>Leishmania s.p.</i> (IFI – Leismaniasis, sustrato promastigotes <i>L. braziliensis</i>).....	75
IX.	RESULTADOS.....	76
1.	Clasificación de los pacientes involucrados en el estudio según sexo.....	

	76
2. Clasificación de los pacientes involucrados en el presente estudio según procedencia.....	77
3. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con EVANTA.....	77
4. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con EVANTA.....	80
5. Comportamiento de los títulos de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con EVANTA.....	82
6. Comportamiento de los niveles de anticuerpos de tipo IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con GLUCANTIME (20 días).....	84
7. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con GLUCANTIME (20 días).....	86
8. Comportamiento de los títulos de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con GLUCANTIME (20 días).....	88

9.	Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B” (4 meses).....	90
10.	Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B” (4 meses).....	92
11.	Comportamiento de los títulos de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B” (4 meses).....	94
12.	Determinación del grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG con el éxito al tratamiento leishmanicida.....	96
13.	Correlación de los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con los resultados de las pruebas de ELISA.....	97
X.	DISCUSIÓN.....	99
XII.	CONCLUSIONES.....	109
XIII.	RECOMENDACIONES.....	110
XIX.	BIBLIOGRAFÍA.....	111

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema N°1	Ciclo de vida del vector.....	8
Esquema N°2	Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	12



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1	Mapa epidemiológico por municipios y niveles de riesgo en Bolivia.....	5
Figura N°2	Zona endémica del departamento de La Paz. Casos positivos de Leishmaniasis en el departamento de La Paz...	6
Figura N°3	Insecto vector de <i>Leishmania</i>	7
Figura N°4	Formas morfológicas del parásito de <i>Leishmania</i>	9
Figura N°5	Forma promastigote y forma amastigote.....	10
Figura N°6	Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i>	13
Figura N°7	Lesión cutánea producida por <i>Leishmania braziliensis</i>	15
Figura N°8	Lesión cutáneamucosa producida por <i>Leishmania braziliensis</i>	16
Figura N°9	Signo Patognomónico de Leishmaniasis <i>visceral</i>	17
Figura N°10	Toma de muestra de lesiones a pacientes con <i>Leishmania cutánea</i> para diagnóstico de laboratorio por método del Frotis.....	37

Figura N°11	Observación microscópica de los promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio de cultivo Schneider (aumento 40x).....	39
Figura N°12	Macrófago lleno de parásitos de <i>Leishmania</i>	43
Figura N°13	Administración de antimoniales pentavalentes.....	53
Figura N°14	Administración de Anfotericina “B”.....	54
Figura N°15	Manipulación y cultivo de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> siguiendo normas de bioseguridad.....	68
Figura N°16	Procedimiento de lavado de las placas de ELISA.....	70
Figura N°17	Pre-tratamiento de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> para la preparación de improntas para IFI.....	72
Figura N°18	Procedimiento de la técnica de IFI; a) Sembrado de 30 uL en las placas; b) Lavado de las placas; c) Caja Coplin en agitación.....	73
Figura N°19	Promastigotes observados en microscopio luz ultravioleta/visible con aumento de 40x.....	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N°1	Clasificación de los pacientes con leishmaniasis involucrados en el presente estudio según sexo.....	76
Gráfica N°2	Clasificación de los pacientes con leishmaniasis involucrados en el estudio según su procedencia.....	77
Gráfica N° 3	a) Niveles de anticuerpos IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con Evanta en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.....	79
Gráfica N° 4	a) Niveles de anticuerpos IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con Evanta en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.....	81
Gráfica N° 5	Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con EVANTA, incluyendo la disminución del título de anticuerpos en las muestras.....	83

Gráfica Nº 6	a) Niveles de anticuerpos IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con Glucantime en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.....	85
Gráfica Nº 7	a) Niveles de anticuerpos IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con Glucantime en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.....	87
Gráfica Nº 8	Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con GLUCANTIME, incluyendo porcentaje de las muestras.....	89
Gráfica Nº 9	a) Niveles de anticuerpos IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con Anfotericina "B" en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.....	

		91
Gráfica N° 10	a) Niveles de anticuerpos IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con Anfotericina “B” en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.....	
		93
Gráfica N° 11	Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes con tratamiento de ANFOTERICINA “B”, se incluye la disminución del título de anticuerpos en las muestras.....	
		95
Gráfica N° 12	Determinación del grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG con el éxito al tratamiento leishmanicida.....	
		97
Gráfica N° 13	Correlación de los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con los resultados de la prueba de ELISA (que determina anticuerpos IgG anti- <i>Leishmania</i>).....	
		98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1	Tipos de Leishmaniasis.....	14
-----------	-----------------------------	----



ABREVIATURAS



ASL	Antígeno Soluble de <i>Leishmania</i>
BSA	Bovine Seric Albumin (Albumina Sérica Bovina)
DO	Densidad óptica
ELISA	Exume Linded Inmunosorbend Assay (Ensayo Inmunoenzimático ligado a enzimas)
INF	Interferón
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LC	Leishmaniasis Cutánea
LCD	Leishmaniasis Cutánea Difusa
LCL	Leishmaniasis Cutánea Localizada
LMC	Leishmaniasis Mucocutanea
LPG	Lipofosfoglicano
LPMN	Linfocitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolisacarido
LV	Leishmaniasis Visceral
NK	Célula Natural Killer

OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	O-Phenilendiamine (Ortofenilendiamina)
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
SBF	Suero Bovino Fetal
SSF	Solución Salina Fisiológica
TLR	Toll Like Receptors



RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad crónica con manifestaciones clínicas que varían en función de la especie infectante. Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la enfermedad, se asume que el paciente se ha curado cuando existe cierre de la lesión. En el presente estudio se ha determinado el valor pronóstico de la medición de los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-*leishmania* antes y después del tratamiento leishmanicida con los medicamentos: Glucantime, Anfotericina “B” y el extracto crudo de Evanta. Los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-antígenos solubles de *leishmania* fueron medidos por la prueba de ELISA indirecto validada en el laboratorio de histocompatibilidad e inmunogenética del Instituto SELADIS. También, se midieron los niveles de anticuerpos IgG anti *Leishmania* por (IFI) Inmunofluorescencia Indirecta. Los resultados mostraron que en el caso de éxito o fracaso del tratamiento no existen diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos IgG e IgE ($p < 0,05$), se observó que en pacientes tratados con Glucantime y Evanta al mes de culminado el tratamiento los niveles de anticuerpos por ELISA e IFI no se negativizaron alcanzando una disminución promedio del 40%. El tratamiento con Anfotericina “B” mostró ser el más efectivo alcanzándose la negativización de los anticuerpos evaluados por ELISA e IFI ($p < 0,05$) ($\chi^2 = 3,00$). También, se determinó que los resultados de la Inmunofluorescencia guardan mejor correlación que los resultados de ELISA cuando el paciente hace cura clínica de la lesión. Los resultados del estudio han demostrado que es importante medir los niveles de anticuerpos en el seguimiento serológico del paciente tratado para confirmar que el paciente ha realizado la cura clínica y la cura parasitológica, y que el seguimiento post tratamiento en el caso de la Evanta y el Glucantime debería hacerse como mínimo hasta los seis meses ya que al mes de culminado el tratamiento los niveles alcanzados no tienen relación con la cura clínica de la enfermedad.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a chronic infectious disease with clinical manifestations that vary depending on the infecting species. There is no effective treatment for the disease. It is assumed that the patient has been cured when there is closure of the heal. It has been suggested that by evaluating the negativisation of IgG and IgE antibodies levels can be determined if the patient has been cured. In the present study we determined the prognostic value of measuring levels of IgG and IgE anti-Leishmania before and after treatment with leishmanicidal drugs such as Evanta's raw extract, Glucantime and Amphotericin "B". The levels of IgG and IgE anti-soluble Leishmania antigens were measured by indirect ELISA previously validated in our laboratory. Also, we measured the levels of anti-Leishmania IgG antibodies by indirect immunofluorescence (IIF). The results show that in the case of success or failure of treatment there is no significant difference between the levels of IgG and IgE antibodies ($p < 0,05$). Also, it was observed that in patients treated with Glucantime and Evanta after a month of treatment the antibody levels measured by ELISA and IFA not become negative reaching an average decrease of 40%. Amphotericin "B" Treatment showed to be the most effective, reaching negativisation of antibodies levels assessed by ELISA and IIF ($p < 0,05$) ($\chi^2 = 3,00$). Also, it was determined that the IIF results have best correlation that ELISA results when the patient makes clinical healing of the injury. The study results have shown that it is important to measure the levels of antibodies for the serological monitoring of treated patients in order to confirm that patients have both clinical and parasitological cure and determined that post-treatment follow-up in the case of the Evanta and Glucantime should be done until six months, since following after a month of treatment the antibodies levels are not related to clinical cure of the disease.

I. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis comprenden un grupo de enfermedades causada 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. El espectro de presentación de la enfermedad va desde úlceras cutáneas que se curan espontáneamente, hasta graves afecciones viscerales que pueden comprometer la vida del paciente. (Ryan K., Ray C., 2004).

Las respuestas inmunitarias frente a las infecciones por parásitos que es el caso de leishmaniasis, se caracterizan por la elevación de las concentraciones de IgE e IgG y por la eosinofilia, y dependen de la citocinas secretadas por las células TH2. (Roberts H., 2000)

Las *Leishmanias* poseen una serie de estrategias complejas para atacar, infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. El huésped falla en controlar al patógeno 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, es por esta razón que hay lesiones que se curan espontáneamente, las cuales están asociadas con una respuesta positiva de las células T antígeno específicas. Las formas viscerales y cutáneas difusas están asociadas con una respuesta débil o ausente, y la forma mucocutánea asociada a una hiper respuesta de las células T. (Roberts H., 2000)

Las leishmaniasis son enfermedades parasitarias de mayor prevalencia en el mundo, está presente en 88 países, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales de América, Europa, Asia y África. Afecta principalmente a la población que habita en áreas rurales y semiurbanas donde prevalece la pobreza

y donde los sistemas de salud son poco eficientes. (Ampuero J., Urdaneta M., 2010).

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de enfermar con leishmaniasis. En el año 2012, se reportaron 2892 nuevos casos confirmados de leishmaniasis. Los datos disponibles aun son considerados parciales y no revelan la magnitud del problema. (Escuela de Salud, Biblioteca, SNIS / Ministerio de Salud y Deportes, 2013).

Es por esta razón, como herramienta de diagnóstico de Leishmaniasis y por medio de laboratorio se utilizan las siguientes técnicas: Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales no son lo suficientemente precisas para determinar si el paciente hizo o no cura parasitológica de la misma. En el presente trabajo planteamos utilizar dos pruebas de ELISA tipo indirecto, previamente estandarizadas (Choquehuanca et. al.) para determinar los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE anti- *Leishmania*, que sean capaces de identificar a estos dos tipos de anticuerpos como marcadores de diagnóstico y respuesta al tratamiento, como valor pronóstico favorable o no en la resolución de la enfermedad, brindando al clínico una herramienta más de apoyo que le permita tomar decisiones oportunas referidas al tratamiento y control de pacientes con leishmaniasis. (Henao H., Osorio Y., 2004).

II. MARCO TEÓRICO

Las leishmaniasis son un conjunto de afecciones parasitarias debidas a protozoarios del género *Leishmania*, se transmiten por la picadura de mosquitos dípteros hematófagos; (Flebótomos) viejo mundo y (Lutzomyas) nuevo mundo; que viven en las zonas tropicales y subtropicales del viejo mundo, del nuevo mundo y de Bolivia.

La infección se caracteriza por lesionar la piel y/o mucosas del hombre y de diferentes especies de animales silvestres y domésticos; preferentemente son afectadas personas que residen y trabajan en las regiones endémicas de la enfermedad, y algunas etnias que habitan estos lugares. (Ryan K., Ray C., 2004).

A. EPIDEMIOLOGÍA.-

Al ser la Leishmaniasis una de las enfermedades de más alta prevalencia en zonas tropicales y subtropicales del mundo, actualmente las estadísticas reflejan la siguiente situación.

- 90% de Leishmaniasis visceral (LV) está en 5 países: Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil.
- 90% de Leishmaniasis cutánea (LC) está en 8 países: Afganistán, Algeria, Brasil, Irán, Colombia, Perú, Bolivia, Arabia Saudita y Siria
- 90% de Leishmaniasis mucocutanea (LMC) son de Brasil, Bolivia y Perú
- Está presente en toda América excepto Canadá y Chile
- 12 millones de personas infectadas en todo el mundo
- 250 mil casos nuevos de Leishmaniasis cutánea (LC)
- 70 mil casos nuevos de Leishmaniasis visceral (LV)
- 10 mil casos nuevos de Leishmaniasis mucocutanea (LMC)

Por cada caso diagnosticado, tratado y reportado, se presume que hay al menos 3 casos no detectados, esto fundamentalmente debido a registros pobres e incompletos en los sistemas de salud. (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

La leishmaniasis según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se divide en dos patrones epidemiológicos descritos a continuación:

1. Patrón epidemiológico 1

Está asociado a deforestación, por motivo de construcción de viviendas, asentamientos no planificados, agricultura, caza, pesca, explotación aurífera.

Antropozoonosis de animales silvestres que puede agredir al hombre cuando entra en contacto con focos zoonóticos en bosque primario.

2. Patrón epidemiológico 2

Está presente en regiones de colonización antigua, relacionado con procesos migratorios, ocupación de poblaciones semiurbanizadas, periferia de centros poblacionales.

No está asociado a deforestación, pueden jugar un papel importante como reservorios canes, equinos, roedores discutiéndose la posible adaptación de vectores y parásitos en ambientes modificados. (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

Respecto a la epidemiología en Bolivia han sido encontradas cuatro formas clínicas de Leishmaniasis: Leishmaniasis mucocutánea (LMC); Leishmaniasis cutánea (LC); Leishmaniasis cutáneo-difusa (LCD) y Leishmaniasis Visceral (LV), las cuales son causadas por: *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (L) amazonensis*; *Leishmania (L) chagasi* y *Leishmania (V) guyanensis*.

Las formas predominantes son la Leishmaniasis cutánea (LC), que aproximadamente representa el 90% de las notificaciones, el restante 10% corresponde a Leishmaniasis mucocutánea (LMC) y las últimas especies generan casos clínicos esporádicos. (Organización Panamericana de la Salud, 2011).

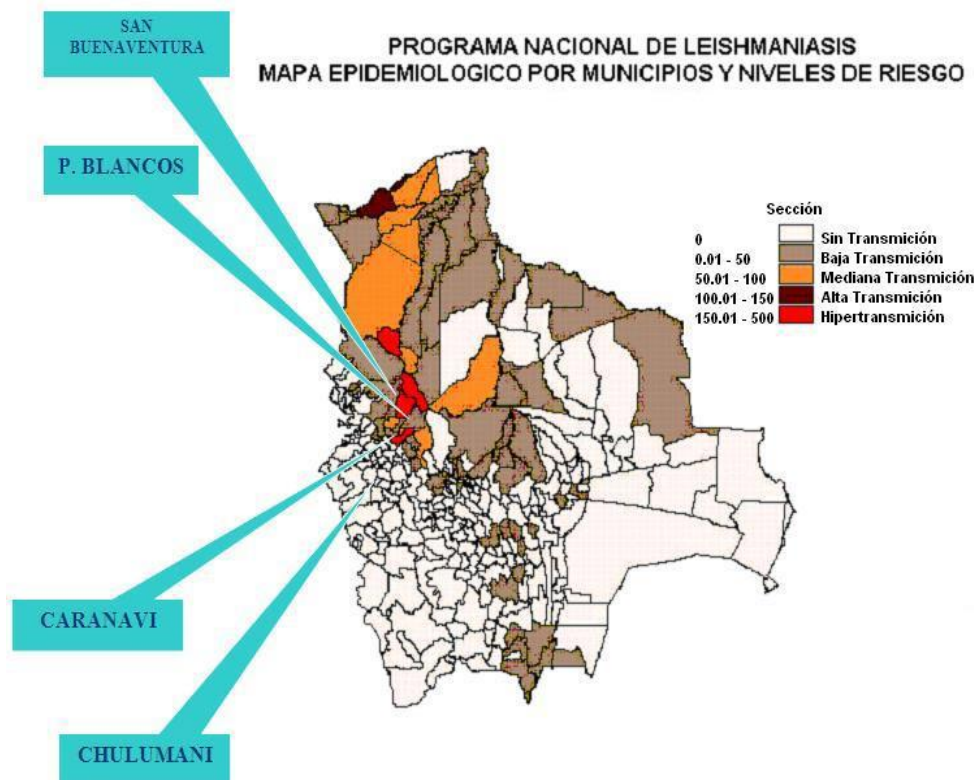
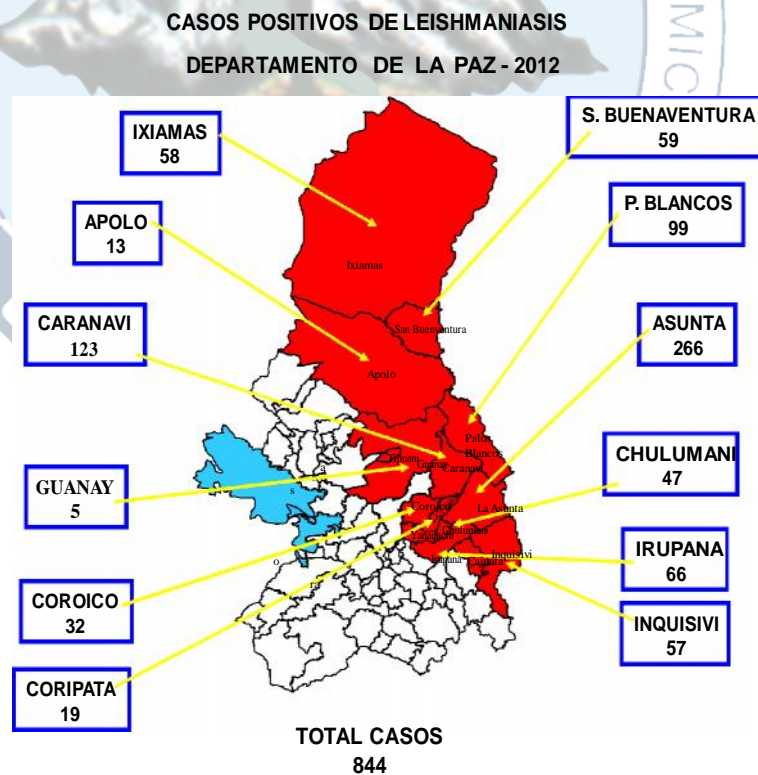


FIGURA Nº 1 Mapa epidemiológico por municipios y niveles de riesgo en Bolivia

Disponible en <http://www.ops.org.bo/textocompleto/nsp16017.pdf>

En los años 2011 y 2012 en el departamento de La Paz se reportaron 730 y 844 casos respectivamente con una tasa de incidencia por 100.000 habitantes de 25,33 (2011) y 27,64 (2012). (*Escuela de Salud, Biblioteca SNIS – Ministerio de Salud y Deportes 2013*).

De los 844 casos en el departamento de La Paz, por municipios los casos se reportaron de la siguiente manera: Ixiamas 58 casos, Apolo 13 casos, Caranavi 123 casos, Guanay 5 casos, Coroico 32 casos, Coripata 19 casos, San Buena Ventura 59 casos, Palos Blancos 99 casos, Asunta 266 casos, Chulumani 47 casos, Irupana 66 casos y en Inquisivi 57 casos (Ayata 5 casos, Cairoma 2 caso, Cajuata 28 casos, Chuma 2 casos, Mapiri 2 casos, Tacacoma 3 casos, Teoponte 11 casos, Yanacachi 4 casos). (*Escuela de Salud, Biblioteca, SNIS / Ministerio de Salud y Deportes - 2013*).



**FIGURA Nº 2 Zona endémica del departamento de La Paz
Casos positivos de Leishmaniasis en el departamento de La Paz**
Disponible en www.sns.gob.bo. 2013

B. LEISHMANIASIS.-

La leishmaniasis es transmitida a los humanos (huéspedes vertebrados) por la picadura del vector flebotomino hembra.

1. Vector.-

El vector mide aproximadamente de 2 a 3 mm, su cuerpo y alas son cubiertas de pelo, tiene un cuerpo giboso, vuelo cortó y bajo, generalmente la actividad es crepuscular. (Murray H., Berman J., 2005).

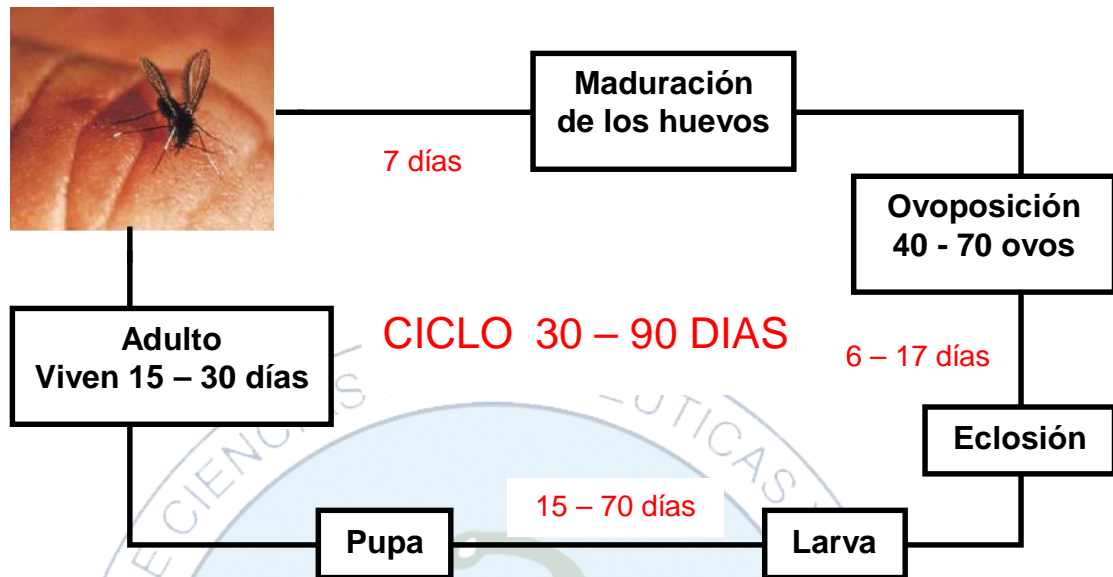


FIGURA Nº 3 Insecto vector de *Leishmania*

Disponible en <http://buscaterapias.cl/que-es-la-leishmaniasis>

2. Ciclo de vida del vector.-

El ciclo de vida del vector dura desde 30 días hasta 90 días, donde se lleva a cabo la maduración de los huevos, ovoposición, eclosión, larva, pupa para convertirse en adulto. (Davies C., Saravia N., 2005).



ESQUEMA N° 1 Ciclo de vida del vector

Elaboración propia

El vector flebotomino hembra infecta a los mamíferos por inoculación del promastigote dentro de las heridas hemorrágicas creadas en la piel mientras se alimentan de la sangre.

Tras la picadura del flebotomino hembra, los promastigotes albergados en la proglotide del vector infectan al huésped, luego estos son internalizados por células fagocíticas, principalmente macrófagos, sufriendo una posterior transformación a la forma amastigote dentro la vacuola parasitófora. Los amastigotes mantienen el parasitismo en el huésped vertebrado por replicación en la vacuola parasitófora y eventualmente llevan a la destrucción de las células huésped. (Cairó J., 1996).

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 tejidos, placas granulomatosas y

úlceras en el epitelio septal. Asimismo, el cartílago nasal septal presenta células inflamatorias que parecen estar evadiendo el cartílago, en algunos pacientes se observa intensas reacciones inflamatorias que pueden aparecer en los primeros días del tratamiento, también se observa infiltración de células B plasmocitarias, fibroblastos, macrófagos con amastigotes intracelulares. (Momen H., Cupolillo E., 2000).

3. Formas morfológicas.-

Los parásitos de *Leishmania* se caracterizan por presentar dos formas morfológicas que son; la intracelular o amastigote, que se localiza en las células del Sistema Fagocítico Mononuclear del hospedero vertebrado, y la forma extracelular o promastigote localizada en el tracto intestinal del vector vertebrado. (Cairó J., 1996).

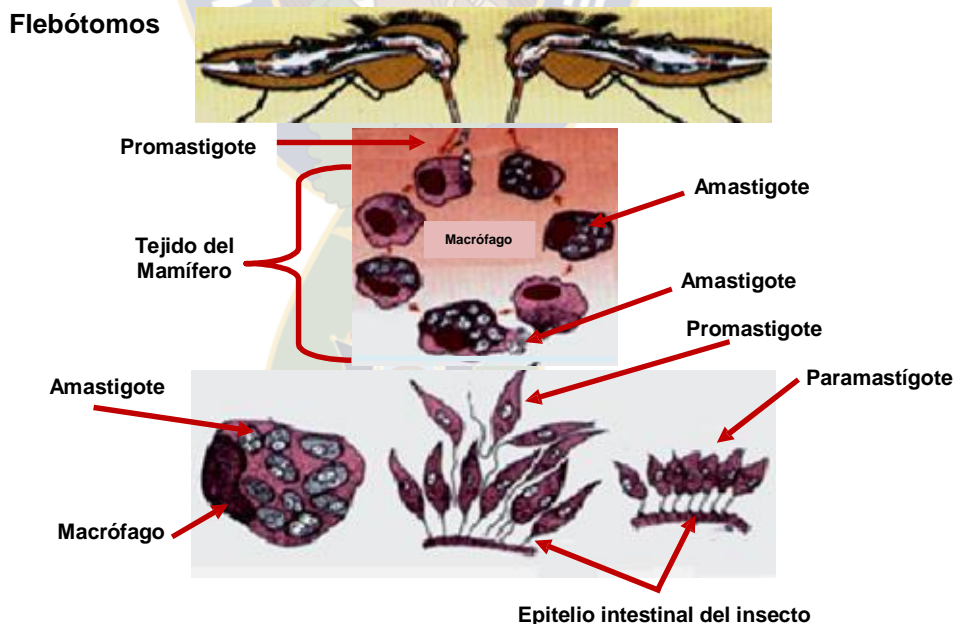
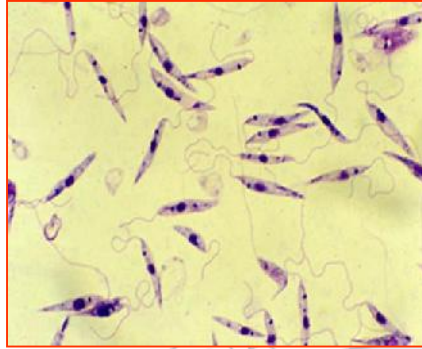
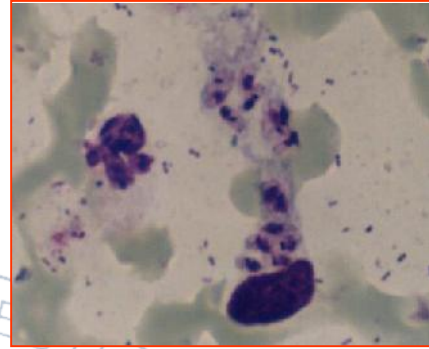


FIGURA Nº 4 Formas morfológicas del parásito de *Leishmania*
 Disponible en <http://infeccion.thelancet.com> 2007.



A. Forma Promastigote



B. Forma Amastigote

FIGURA Nº 5 Forma promastigote y forma amastigote

Disponible en <http://infection.thelancet.com> 2007.

El **promastigote**, es la forma extracelular que se ubica en el intestino de los parásitos, se caracteriza por tener un cuerpo alargado y un flagelo que le permite el movimiento. Esta forma, al ser inoculada dentro de los hospedadores, se transforma en el segundo estado morfológico conocido como amastigote.

Los **amastigotes** se caracterizan por ser redondeados, sin la presencia del flagelo, de 2 a 4 μ (micras) de diámetro con un núcleo y un kinetoplasto (estructura mitocondrial especializada que contiene ADN). Esta forma parasitaria es la visualizada en los frotis y biopsia para el diagnóstico de la enfermedad.

Los amastigotes son exclusivamente intracelulares pero pueden encontrarse en el intersticio en los casos en los que el parásito se reproduce hasta ocasionar la ruptura de la célula hospedadora. (Murray H., Berman J.2005).

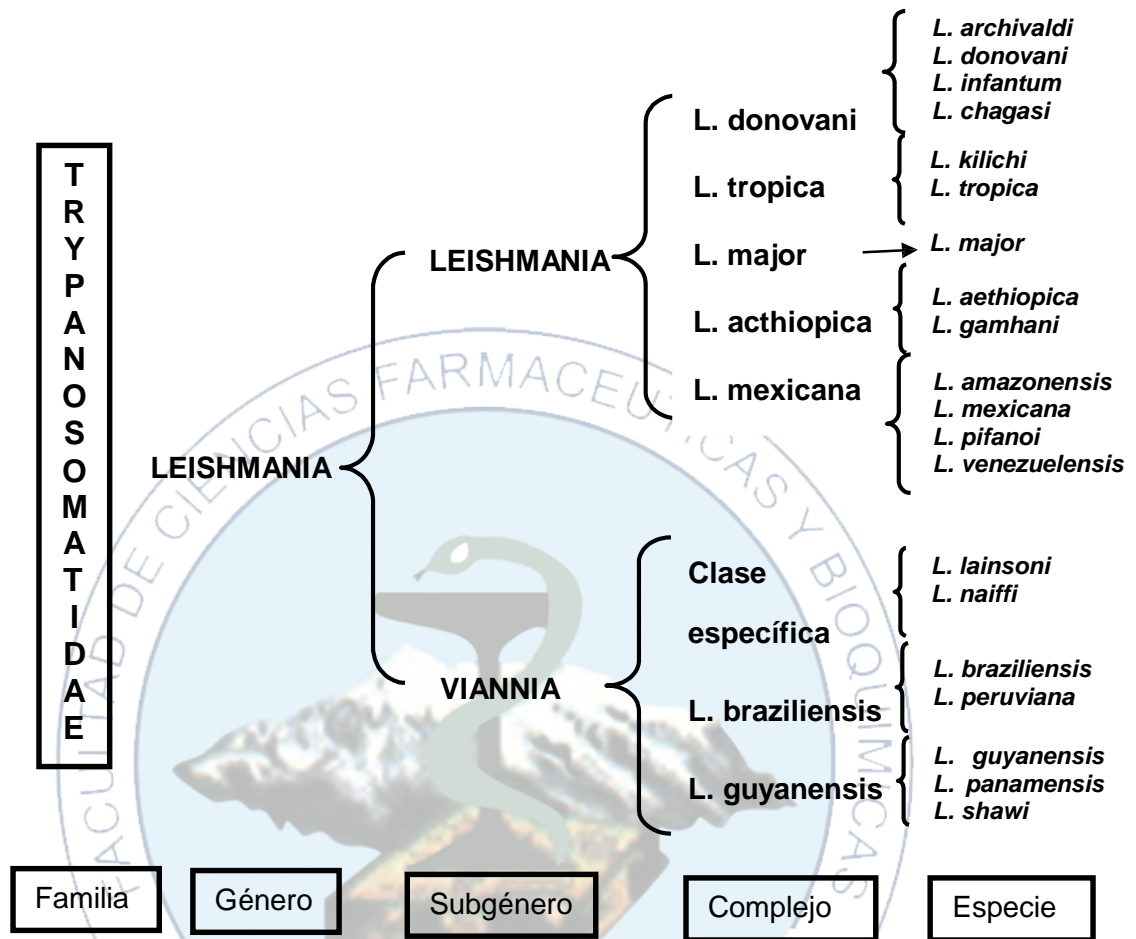
El amastigote tiene forma ovalada o redondeada, carece de flagelos y de membrana ondulante y, por tanto, es inmóvil. En los preparados teñidos con Wright y Giemsa se observa una membrana citoplasmática, que le sirve de sostén

y envoltura; un citoplasma azul claro y, ocasionalmente, un cariosoma central o excéntrico. En el citoplasma está incluido 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. (Chávez A., 2002).

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. (Corona F., 2008).

C. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *LEISHMANIA*

El género *Leishmania* comprende dos grandes subgéneros; *Viannia* y *Leishmania*, que comprende varias especies patógenas para el hombre; siendo las más importantes las siguientes:



ESQUEMA Nº 2 Clasificación taxonómica del género *Leishmania*
 Elaboración propia (Fuente OMS)

D. CICLO BIOLÓGICO.-

La *Leishmania* es heterogénea y puede producir diferentes ciclos:

Primer ciclo, 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. (Bonfante R., Barruela S., 2002)

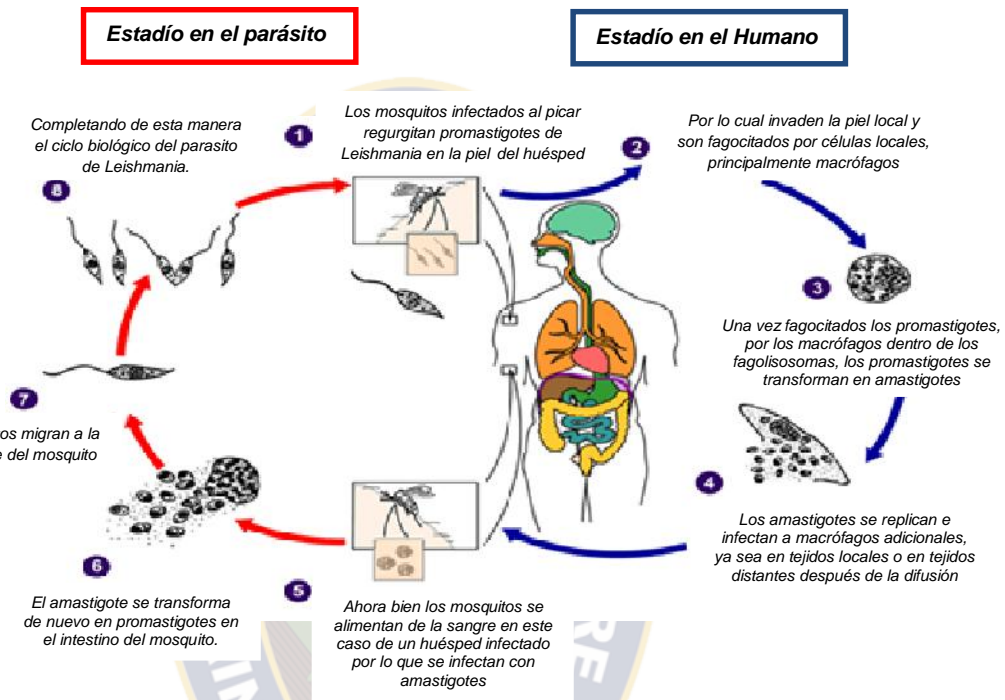


FIGURA Nº 6 Ciclo Biológico de *Leishmania*

Los mosquitos infectados al picar regurgitan promastigotes de *Leishmania* en la piel del huésped (1), por lo cual invaden la piel local y son fagocitados por células locales, principalmente macrófagos (2). Una vez fagocitados los promastigotes de *Leishmania* por los macrófagos, dentro de los fagolisosomas de los macrófagos residentes, los promastigotes se transforman en amastigotes (3), estos amastigotes se replican e infectan a macrófagos adicionales, ya sea en tejidos locales o en tejidos distantes después de la difusión (4). Ahora bien los mosquitos se alimentan de la sangre en este caso de un huésped infectado (5), por lo que se infectan con amastigotes (6), que se transforma de nuevo en promastigotes en el intestino del mosquito (lo cual depende de la especie de *Leishmania*, porque existe diferentes regiones del intestino del mosquito que son parasitadas) (7). Los parásitos migran a la probóscide del mosquito (8), completando de esta manera el ciclo biológico del parásito de *Leishmania*.

Disponibile en <http://infection.thelancet.com> 2007.

E. TIPOS DE LEISHMANIASIS.-

La clasificación es la siguiente:

- a) Cutánea localizada y Cutánea difusa
- b) Cutaneomucosa.
- c) Visceral o kala-azar. (Chávez A., Sáenz M., 2002).

FORMA	PRESENTACIÓN	AGENTES
Leishmaniasis Cutánea	1. Localizada 2. Diseminada 3. Difusa	<i>L. amazoniensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. trópica</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. lainsoni</i>
Leishmaniasis Mucosa	4. Tardía 5. Indeterminada 6. Primaria	<i>L. braziliensis</i>
Leishmaniasis Mucocutánea	Concomitante Contigua	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazoniensis</i>
Leishmaniasis Visceral	Ganglionar inicial	<i>L. braziliensis</i> <i>L. donovanni</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>
Forma Inaparente	Sub clínica	Todos

TABLA Nº 1 Tipos de Leishmaniasis

Elaboración propia

1. Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

a. Primer estadio de la úlcera primaria (Lesión cutánea)

Ocurre en áreas expuestas a la picadura de insectos entre dos a cuatro semanas después de ésta y es inversamente proporcional al inóculo.

La localización más frecuente es en las partes expuestas (brazos, piernas, cara), indoloras salvo infección bacteriana y presenta prurito solo el 60% de los pacientes. En el sitio de la picadura aparece un nódulo eritematoso asintomático de 1 a 10 cm de diámetro, que en el transcurso de 1 a 3 meses se agranda y transforma en una úlcera de bordes indurados y de coloración violácea. Las úlceras pueden ser únicas o múltiples redondeadas, de fondo limpio e indoloras si no están infectadas secundariamente. Los sujetos con LCL ocasionalmente curan espontáneamente en un lapso de 6 meses a 4 años, dejando una placa deprimida y discrómica con telangiectasias. (Assis R., 2012).

b. Segundo estadio con lesiones cicatrízales

Si la úlcera primaria no recibe tratamiento adecuado, cicatriza espontáneamente al cabo de 12 o 18 meses, la cicatriz se asemeja a la de una quemadura. El parásito diseminado al Sistema Retículo Endotelial se queda en estado de latencia y después de un tiempo variado (meses o años) se reactiva y pasa al tercer estadio. (Gramiccia M., 2011).



A. Lesión en proceso de cicatrización de *Leishmania braziliensis*

B. Lesión activa de *Leishmania braziliensis*

FIGURA Nº 7 Lesión cutánea producida por *Leishmania braziliensis*

Gentileza Dr. Rolando Parra (Palos Blancos – La Paz – Bolivia) Proyecto O.S.C.A.R.

2. Leishmaniasis cutaneomucosa (LCM)

a. Tercer estadio, úlceras secundarias (Lesiones mucosas)

Inicialmente es afectada la mucosa nasal, con prurito, dolor moderado, obstrucción, secreciones, sangrado fácil, disnea y aparece una pequeña ulcera en el tabique por lo cual la región vecina es comprometida con perforación (deformidad), con invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea y siempre se desarrolla después de que desaparecen las lesiones cutáneas; ocasionalmente puede presentarse hasta 20 años después de adquirir la infección.

A medida que la enfermedad avanza provoca la caída de la pirámide nasal, afectando faringe, laringe, lengua, labios y el paciente muere por neumonía, obstrucción laríngea (asfixia), desnutrición por no poder comer y con infección sobre añadida. ((Arenas, R., Flisser A., 2006).



A. *Leishmania cutaneomucosa*



B. *Leishmania cutaneomucosa*

**FIGURA Nº 8 Lesión cutáneomucosa producida por
*Leishmania braziliensis***

Gentileza Dr. Rolando Parra (Palos Blancos – La Paz – Bolivia) Proyecto O.S.C.A.R.

3. Leishmaniasis visceral (LV)

La leishmaniasis visceral (enfermedad sistémica) puede ocasionar complicaciones mortales. Cuando el insecto vector pica, este parásito migra a la médula ósea, al bazo y a los ganglios linfáticos y afecta al sistema inmune disminuyendo el número de linfocitos que combaten la enfermedad.

Generalmente tiene un periodo de incubación de 3 a 8 meses, aunque existen informes que indican que el periodo de incubación puede ser hasta 34 meses. Produce lesiones en el sistema reticuloendotelial, y se manifiesta por adenomegalias, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, fiebre (intermitente y generalmente con dos picos al día), pérdida de peso, astenia, pigmentación cutánea, así como áreas hipopigmentadas en frente y alrededor de la boca, las manos y la línea central del abdomen. (Pastor S., 2012).

En los niños, la infección sistémica empieza regularmente de una manera súbita con vómitos, diarrea, fiebre y tos. En los adultos, se presenta una fiebre que dura de dos semanas a dos meses, acompañada de síntomas inespecíficos como astenia y anorexia. (Flisser A., 2006).



A. *Leishmaniasis visceral*



B. *Leishmaniasis visceral*

FIGURA Nº 9 Signo Patognomónico de Leishmaniasis Visceral

Disponible en <http://facmed.unan.mx.deptos/parasitología>

F. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.-

La enfermedad empieza con la inoculación de 5.000 a 100.000 promastigotes de *Leishmania* por cada picadura del mosquito transmisor en 1 mm^2 de piel, este vector al picar al mamífero se alimenta con sangre de un vertebrado infectado, e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes dentro de la piel. La transformación del amastigote a promastigote ocurre en el estómago del vector dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. (Alvar J., Molina., 2004).

Algunos promastigotes quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared intestinal por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a la especie del vector y de *Leishmania*. (Barruela S., 2002)

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 son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, 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. (Barruela S., 2002)

La saliva del mosquito contiene anticoagulantes y vasodilatadores que facilitan la hemorragia y tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados. En los vectores excesivamente infectados, la proboscis esta 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, permanecen en estadio estacionario por 36 horas aproximadamente y, luego empiezan a reproducirse. (Chávez A., 2002).

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)** con actividad metaloproteasa (la cual es abundante en la superficie de los promastigotes que inhibe la lisis mediada por complemento y promueve la captación del parásito mediante la transformación de C3b en C3bi)

y el **lipofosfoglicano (LPG)** un glicofosfolípido anclado a la membrana mediante glicosilfosfatidil inositol (GPI). El LPG es el mayor glicoconjugado que se expresa en toda la superficie del parásito incluido el flagelo facilitando la entrada del parásito en la célula, también tiene la función de resistir la destrucción del parásito cuando el mosquito digiere los alimentos y hace que el parásito se ancle al intestino para que no sea eliminado con los alimentos. (Berkow, R., 2008).

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 e intermediarios dependientes del oxígeno, lo que refleja una adaptación al crecimiento intracelular. (Bonfante R., 2002).

G. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.-

Las respuestas inmunitarias frente a las infecciones por parásitos como en el caso de Leishmaniasis, se caracterizan por la elevación de las concentraciones de IgE, por la eosinofilia y dependen de la citocinas secretadas por las células TH2.

Se sabe que la elevación de IgE sérica es una respuesta al estímulo de la IL-4 cuando se administra anticuerpos neutralizantes específicos de la IL-4 y la eosinofilia se debe a la expresión de la IL-5, porque se inhibe con anticuerpos anti IL-5. El bloqueo de la IL-5 por anticuerpos anti IL-5 también, induce una disminución de los niveles de eosinófilos. (Roberts H., 2000)

1. Los parásitos inducen la expresión específica e inespecífica de Anticuerpos

En el curso de estas infecciones parasitarias se produce una hipergammaglobulinemia inespecífica, debida probablemente a sustancias liberadas por los parásitos que actúan como mitógenos de las células B. La importancia de las respuestas dependientes e independientes de anticuerpos es diferente según el tipo de anticuerpo:

- ✓ Los anticuerpos pueden actuar directamente sobre los parásitos, ya sea por sí solos o mediante la activación del complemento.
- ✓ Los anticuerpos pueden neutralizar directamente a un parásito, impidiendo su unión a los receptores específicos presentes en las células no infectadas del huésped.
- ✓ Los anticuerpos pueden estimular la fagocitosis por parte de los macrófagos. La fagocitosis es aún más intensa cuando es potenciada por el Sistema del Complemento. Estos efectos están mediados por los receptores de Fc y de C3 de los macrófagos, cuyo número puede aumentar como consecuencia de la activación de estas células.
- ✓ Los anticuerpos también intervienen en respuestas de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos. Las células citotóxicas como los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos se adhieren a los parásitos recubiertos previamente de anticuerpos mediante sus receptores de Fc y de C3, y llevan a cabo un proceso de exocitosis de gránulos tóxicos sobre la superficie del parásito. (Corona J., 2008).

2. Cambio de isotipo a IgE

Las células B estimuladas por células TH2 en función al patrón de citoquinas que liberen pueden cambiar el isotipo del anticuerpo secretado Ejm: de IgM a IgE. La producción de IgE que la célula TH2, libere IL-4. Las TH2 aparecen cuando las células T CD4 naïve (vírgenes, que no han interactuado previamente con antígeno) se encuentran con el antígeno por primera vez en presencia de IL-4.

La importancia de IL-4 para dirigir la producción de IgE se aprecia en ratones, que carecen de un gen funcional de IL-4: la principal anormalidad en dichos animales parece ser una reducción de la síntesis de IgE. En el ratón, se ha demostrado que la producción temprana de IL-4 es resultado de la activación de una pequeña subpoblación de células T CD4, las NK, que interactúan con las células presentadoras de antígeno que portan una molécula similar al MHC de clase I no clásica, CD1. (Bonfante R., 2008).

3. Papel de los mastocitos y eosinófilos en la expulsión de los parásitos

El papel de los mastocitos en la eliminación de parásitos viene sugerido por la mastocitosis intestinal. Un estudio que se realizó en ratones mutantes con deficiencia de mastocitos, mostró una eliminación disminuida de los nematodos intestinales, ya que carecen de IL-3, de mastocitos funcionales y no pueden producir basófilos en respuesta a infecciones por helmintos.

Los mastocitos se activan por anticuerpos IgE unido a receptores Fc específicos de IgE (FC ϵ RI) y de IgG (FC γ RIII), liberando sus gránulos y secretando mediadores lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos) y citocinas. (Chirinos R., 2008)

Los eosinófilos son granulocitos que pueden expresar FC ϵ RI solamente cuando son activados y reclutados al foco de inflamación.

La activación de los mastocitos se produce cuando la IgE unida al receptor de superficie celular se entrecruza con un antígeno multivalente. Esta señal activa al mastocito induciendo la liberación del contenido de sus gránulos, en cuyo interior tienen mediadores inflamatorios preformados. También, como producto de la activación los mastocitos secretan citocinas entre las que se encuentran IL-3, IL-4, GM-CSF y TNF- α , así como una proteasa. Estas citocinas provocan modificaciones de la permeabilidad intestinal y la descamación del epitelio, lo que también es útil para expulsar a los parásitos. En infecciones intestinales las células caliciformes recubren con moco a los helmintos, justo antes de su expulsión. Se sabe que esta respuesta es específica, porque solo se produce en animales inmunizados. La modificación de la permeabilidad de la mucosa inducida por los mediadores liberados por los mastocitos, permite que el complemento y los anticuerpos sean secretados a la luz intestinal. También, es posible que estos mediadores ejerzan algún efecto sobre la musculatura lisa intestinal, contrayéndola, de manera que facilite la expulsión del parásito mediante movimientos peristálticos.

Los eosinófilos están típicamente asociados a estas infecciones y se cree que evolucionaron como sistema de defensa específico frente a las fases tisulares de aquellos parásitos cuyo excesivo tamaño impide que puedan ser fagocitados. Parece ser que las reacciones de los mastocitos dependientes de la IgE favorece la quimiotaxis de los eosinófilos hacia el parásito y estimulan sus propiedades antiparasitarias.

La importancia de estas células se demuestra en modelo murino cuando en ausencia de eosinófilos, los ratones son incapaces de eliminar los helmintos, por

lo que los enquistan para reducir al mínimo sus efectos nocivos. Sin embargo, no siempre los eosinófilos ayudan al huésped en su lucha contra la infección, impidiendo la migración de los parásitos a través de los tejidos, sino que como se ha demostrado en recientes estudios, algunos ratones sin eosinófilos (tratados con antisuero frente a los eosinófilos) presentan una respuesta inmune normal.

Los eosinófilos no poseen propiedades fagocíticas tan acusadas como los neutrófilos. Las perturbaciones de la superficie de su membrana inducen su desgranulación, y su actividad se ve estimulada por citocinas como TNF- α y GM-CSF. Sin embargo la mayoría de sus efectos se encuentran bajo el control de mecanismos específicos de Ag. Así, su unión *in vitro* a larvas de helmintos recubiertas con IgE o IgG estimula la liberación del contenido de sus gránulos sobre la superficie de los parásitos. (Cárdenas E., 2008)

4. Interrelación inmune entre eosinófilos y mastocitos

In vitro se ha observado que la destrucción de los parásitos por parte de los eosinófilos, se ve potenciada por los productos secretados por los mastocitos.

Los antígenos provocan la desgranulación de los mastocitos dependiente de IgE a nivel local, así como la liberación de mediadores. Estos atraen selectivamente a los eosinófilos a la zona de infección y potencian su actividad. Más tarde, ciertos productos de los eosinófilos bloquean la actividad de los mastocitos. (Se ha demostrado que estos mecanismos efectores se pueden producir *in vivo* en los monos, en los que la destrucción de los esquistosomas está relacionada con la acumulación de eosinófilos). (Peres I., Pozo S., 2005).

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es fundamental para la invasión de las células del huésped. La proteína sérica C3 del complemento se deposita

en la superficie del protozoario y reconoce principalmente 2 receptores presentes en la superficie de la *Leishmania*: la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos vía receptor C3 del complemento. Una vez que los promastigotes se fijan al macrófago son englobados en una vacuola parasitófora, que se une a los lisosomas que contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir las *Leishmanias*. (Agerberth B., 2006).

Por otra parte se ha demostrado que TLR-9 se une a motivos CpG no metilados (en DNA de *Leishmania mexicana*) induciendo la sobreexpresión del RNAm de TLR-9 en macrófagos, así como la producción de TNF- α e IL-12. En el sitio de la infección los macrófagos tisulares activados secretan abundantes citoquinas mediadoras de inflamación, incluyendo el TNF- α , citoquinas producidas principalmente por macrófagos activados, las interleuquinas (ILs) IL-1, IL-6 e IL-12, al igual que proteínas C3 del Complemento, siendo las interleuquinas IL-1, IL-2, TNF- α , Factor Transformante Beta (TGF- β), Factor Quimiotactico y Activador de los Monocitos (MCAF), las primeras en sintetizarse después del contacto con el parásito. (Gudmundsson H., 2006).

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 liberando amastigotes que van a infectar otras células. Las *Leishmanias* destruidas por los macrófagos liberan antígenos que son expresados sobre la superficie de una molécula MHC en la membrana de los macrófagos y son presentados a los linfocitos T CD4+ *Leishmania* específicos. Esto favorece la diferenciación de LT CD4+ hacia una célula TH1 que produce IFN- γ que activa los mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno y de óxido nítrico en los macrófagos. (Abbas A., 1996)

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- γ . El IFN- γ 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- γ , que contribuye a la resolución de la infección por *L. donovani*. (Murphy K., 1999).

Otros estudios han mostrado que la ausencia de IFN- γ es responsable del desarrollo de la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis cutánea difusa. En la leishmaniasis cutánea americana, los linfocitos T producen IFN- γ 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. (Sherh M., 1996)

En estudios que usan ratas como modelo experimental 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- γ 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- γ . 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. (Chmielewski M., 2004).

Recientes estudios han descrito 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 antimicrobiana. 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, permitiendo así 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- γ 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. (Corona F., Bonfante G., 2008).

También, se demostró en modelo murino que la saliva del flebotomino inhibe la expresión de TNF y que por otro lado incrementa la expresión de IL-6 por parte de los macrófagos. Una vez que el promastigote es inoculado en el espacio extracelular que expuesto a la acción lítica u opsonizante del sistema del complemento, los promastigotes de *Leishmania* son destruidos por la vía alterna de activación del complemento la cual se inicia por la unión de las proteínas fijadoras de manosa (PFM) a los residuos de manosa presente en la superficie del promastigote y culmina con la formación del complejo de ataque a la membrana. Las *Leishmanias* son susceptibles a ser destruidas por el sistema del complemento en cualquiera de sus formas. Los promastigotes se valen de la capacidad opsonizante de las PFM y del componente C3b para unirse a sus receptores correspondientes (CR1 y CR2) en la superficie del macrófago para iniciar el proceso de fagocitosis. (Hombach A., Heuser C., 2004).

Los amastigotes liberados después de que los macrófagos que albergan al parásito estallan serán destruidos también por la vía clásica de activación del complemento que se debe a la unión de anticuerpos IgG e IgM al parásito. Se tiene reporte que los anticuerpos IgA e IgE contra *Leishmania* promueven la destrucción del parásito por activación de la vía alterna del complemento.

Tras la multiplicación intracelular de amastigotes localizados en los macrófagos y las células dendríticas en el sitio de inoculación, las reacciones celulares generadas y las diversas citoquinas producidas dan lugar al desarrollo de una lesión cutánea localizada en la LCL, la lesión primaria es una pápula eritematosa que presenta una base firme, indurada e hiperémica, que aparece de dos a ocho semanas después de la picadura del insecto vector, crece lenta progresivamente, en las partes expuestas del cuerpo. Presentan bordes irregulares y son indoloras. Muchas de las úlceras involucionan sin tratamiento en un lapso de 8 meses, especialmente las ocasionadas por *Leishmania mexicana*. Por su parte, en las

acompañadas por *Leishmania braziliensis* se presentan lesiones cutáneas acompañadas de linfadenopatías. Las cicatrices, consecuencia de las úlceras, son moteadas y deprimidas. (Corona F., Bonfante G., 2008).

El contacto entre *Leishmania* y las células inmunocompetentes favorece una respuesta inmunitaria dirigida a la eliminación del parásito. La epidermis parece tener importancia en el inicio del proceso inflamatorio. Hay factores que pueden afectar el proceso inmunorregulador, entre ellos células epidérmicas presentadoras de antígenos (Langerhans y queratinocitos), células T efectoras, y citocinas. (Holtmeier W., 2005).

En la leishmaniasis cutánea hay abundantes células de Langerhans, queratinocitos, moléculas de adherencia celular 1 (ICAM-1) y del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II (HLA-DR), así como acumulación selectiva de linfocitos T epidermotrópicos que expresan antígenos relacionados con la función de leucocitos (LFA1), y generación de respuesta Th1. (Berkow, R., 2008).

5. Aspectos inmunológicos de la piel

La piel es una parte importante del sistema inmunológico donde ocurren una serie de respuestas complejas, tanto humorales y celulares. Por esta razón, la piel ha sido considerada como un órgano inmunológico autosuficiente, compuesto de células inmunocompetentes (Células de Langerhans epidérmicas, queratinocitos y linfocitos T); la unidad perivascular dérmica (células endoteliales, pericitos vasculares, linfocitos T, mastocitos y dendrocitos dérmicos); citoquinas y quimosinas interactuantes. (Pancer Z., Cooper D., 2006).

Los procesos inflamatorios en piel proponen tres modelos de enfermedad cutánea:

El modelo citotóxico donde se da la fase efectora de la respuesta inmunitaria

El modelo tolerogénico, caracterizado principalmente por la falta de participación del queratinocito como célula inmunocompetente accesoria, lo cual promueve un estado de anergia selectiva.

El modelo proinflamatorio, caracterizado por estancamiento de células inflamatorias en piel como consecuencia de pocas señales accesorias por parte de las células de Langerhans y excesiva expresión de ICAM-1 por los queratinocitos. (Rus H., 2005 - Agerberth B., 2006).

En la forma cutaneomucosa por acción de una citosina inhibitoria, el factor de transformación de crecimiento beta (TGF- β), provoca desequilibrio en las poblaciones de linfocitos, la existencia de títulos bajos de interferón gamma (IFN- γ) y superproducción de interleucina 4 (IL-4), todo este proceso aumenta la citotoxicidad de los macrófagos e inhibe la activación de la síntesis de interleucina 1 (IL-1) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); también existe la generación de radicales superóxido por el macrófago que corresponde a la principal defensa contra microorganismos patógenos intracelulares.

En este tipo de *Leishmania* hay expresión exacerbada de ICAM-1, HLA-DR y queratinocitos; pérdida de células de Langerhans de tráfico de linfocitos y granulomas Th1 y Th2. (Berkow, R., 2008 - Matzinger P., 2002).

6. Inmunidad humoral frente a leishmaniasis

En la leishmaniasis se destaca la importancia y complejidad de la respuesta inmunitaria del hospedador frente al parásito. Aparecen procesos inmunológicos diferentes, tanto humorales como celulares, y se observa también un amplio espectro de desordenes y alteraciones inmunitarias. Donde la presencia de anticuerpos contra el parásito es la característica principal de la respuesta Th2 inducida por el parásito, los anticuerpos más representativos que participan en este tipo de respuesta son la Inmunoglobulina G y la Inmunoglobulina E principalmente. (Gould H. - Fitzsimmons C., 2007).

a. La inmunoglobulina E (IgE)

Es un tipo de anticuerpo que está implicado en la alergia (especialmente asociado con el tipo I de hipersensibilidad), y la respuesta inmune efectiva contra diversos agentes patógenos, por lo que sus niveles suelen estar bastante elevados tanto en paciente alérgicos como en personas que sufran alguna parasitosis.

El reconocimiento de un antígeno por la IgE desencadena complejas reacciones inmunitarias, por ejemplo: la degranulación de los mastocitos, que liberan sustancias vasoactivas (histamina, heparina, leucotrienos IL4, IL5, IL13 que son mediadores de la inflamación y la respuesta inmune TH2) produciendo el aumento de la permeabilidad capilar, aumento de la contracción de musculatura lisa, aumento de la hipersecreción de moco, así como la intervención de los eosinófilos y anticuerpos IgE en la respuesta inflamatoria.

Cuando una persona es alérgica a una sustancia en particular, el sistema inmunitario cree erróneamente, que está bajo una invasión antigénica por

parásitos, y en un intento de "proteger" el organismo produce IgE. (Gould H. - Erb K.J., 2007).

El mecanismo por el que se produce IgE inicia de la siguiente manera:

Cuando un alérgeno ingresa a un organismo, es reconocido y fagocitado por las células dendríticas, las cuales realizan una presentación antigénica mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHC – Clase II) a las células CD4, las cuales a su vez estimulan la diferenciación de Linfocitos T (Th2); las células Th2 por acción de la IL4 estimulan a los LB para convertirse en células plasmáticas productoras de IgE, estos anticuerpos se fijan en los receptores $F_{c\epsilon R}$ III de los mastocitos promoviendo en estos la liberación de sustancias vasoactivas responsables de la inflamación y daño tisular. (Rojas W., Anaya JM. 2007).

La vida media de la IgE en sangre periférica es de 24 – 48 horas, esta se encuentra en forma libre en sangre en donde se observa que los niveles cambian a lo largo de la edad. También, la IgE se encuentra en otros líquidos biológicos así como unida a basófilos y células cebadas, gracias a la propiedad que tiene esta inmunoglobulina de unirse por su extremo Fc a receptores de superficie presentes en dichas células. Estas células se caracterizan por encontrarse en la piel y mucosas y por contener abundantes gránulos citoplasmáticos, ricos en sustancias vasoactivas que liberan una vez se activan. (Galaktionov VG., Chmielewski M. 2004).

Otro proceso de mucha importancia es la **Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)**, cuyo fenómeno citotóxico no es sólo inducido por linfocitos TCD8+, sino también por otras células del sistema inmune como los macrófagos o las células NK que pueden destruir también células mediante la colaboración con anticuerpos. Este proceso se produce cuando un anticuerpo, generalmente

del tipo IgG y en menor proporción IgE reconoce un antígeno en la membrana de una célula y reacciona con ella rodeándola (fenómeno semejante a la opsonización), dejando la fracción Fc libre. Las células con capacidad citotóxica y receptores para Fc, como las células NK y los macrófagos, se unirán al fragmento Fc de la inmunoglobulina e inducirán la citotoxicidad en la célula. En este caso la citotoxicidad es inducida por las células pero la especificidad de la reacción la proporciona el anticuerpo. En este fenómeno intervienen tanto el fragmento Fab (unión a los antígenos de membrana del patógeno) como el Fc (unión al receptor específico en la célula efectora: NK, macrófago). (Pancer Z., Cooper M., 2006).

En estudios con ratones infectados experimentalmente con *Leishmania braziliensis* muestran una activación policlonal que puede ser responsable de las anomalías en la síntesis y secreción de inmunoglobulinas (Igs) que han sido reportadas durante la infección también en humanos. Se ha observado que *Leishmania braziliensis* aumenta su resistencia a la eliminación mediada por Ac, durante su interacción con el Sistema Inmunitario del hospedador. (Zambrano S., Pfaff A., 2008).

Cuando se infectan ratones susceptibles BALB/c con *Leishmaniasis* se ha observado que el octámero sintético p183, agrava el padecimiento al inducir el balance de la respuesta inmune hacia TH2. Las células del ganglio linfático de ratones inmunizados y estimulados con este péptido proliferan intensamente, particularmente células T CD4+, restringidas a moléculas de clase II del MHC, que secretan IL-4 pero escasa IL-2 e IFN- γ . Los ratones BALB/c inoculados con el péptido p183 y posteriormente desafiados con *Leishmania major* desarrollan una enfermedad significativamente exacerbada.

La larga vida de los helmintos dentro de los hospedadores mamíferos indica que los parásitos han desarrollado mecanismos sofisticados para evadir los efectos citotóxicos de la Respuesta Inmunitaria. Así, eluden los efectos del complemento sérico a través de inhibidores moleculares de la activación, y la capacidad que tienen para adquirir proteínas reguladoras sobre su superficie. En relación con este hallazgo, se ha reportado el papel de anticuerpos IgM (que no tienen actividad citotóxica) que bloquean la respuesta efectora de la IgG, pero no de IgE, sobre la superficie de blancos definidos; en un estudio realizado en niños clasificados como resistentes o susceptibles a reinfección, se encontró que en el suero de los primeros los niveles de anticuerpos IgM eran significativamente más elevados que en los resistentes. (Zambrano S., Pfaff A., 2008).

b. La inmunoglobulina G (IgG)

Son las inmunoglobulinas más abundantes y representan más del 70 % de las Igs séricas totales. Esta Ig posee capacidad neutralizante, precipitante, de fijar complemento, de unirse a células NK y a macrófagos (opsonización / ADCC) y son capaces de atravesar activamente las membranas biológicas. La propiedad de atravesar activamente las membranas biológicas es de sumo interés por lo que, además de ejercer esta inmunoglobulina su efecto en toda la “economía del organismo”, lo hace también en el feto al atravesar la placenta desde la madre, merced a la existencia de receptores para la porción Fc en el sincitiotrofoblasto. (Anam K., Afrin F., 1999).

La IgG se sintetiza tardíamente tras un primer contacto con el antígeno, sin embargo, tras un segundo contacto la mayoría de las Igs formadas pertenecen a esta clase. (Galaktionov G., Chmielewski M., 2004).

Esta proteína especializada es sintetizada por el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus. Es la inmunoglobulina más abundante del suero, con una concentración de 600-1.800 mg por 100 mL. La IgG constituye el 80% de las inmunoglobulinas totales.

La determinación de la Inmunoglobulina IgG es de suma importancia en pacientes con *Leishmania*, puesto que es la que participa como efectora de la Respuesta Inmune, junto con los eosinófilos. (Galaktionov G., Chmielewski M., 2004).

Se ha reportado en varios estudios murinos y humanos (Ulrich y col.), que IgG4 específicas para *Leishmania* predominaban en un 95% de los sueros evaluados de pacientes con LCD. Estos resultados sugieren que la evaluación de las subclases de inmunoglobulinas abre una nueva perspectiva para la evaluación de la respuesta humoral en la leishmaniasis, no sólo durante el curso de la enfermedad, sino también en la evaluación de respuestas en esquemas terapéuticos y en los procesos de re-infección o reactivación de la enfermedad. (Zambrano S., Ortiz L. 2002).

H. DIAGNÓSTICO.-

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad es de suma importancia debido a que existen enfermedades provocadas por bacterias y hongos que presentan una clínica similar a la de leishmaniasis, tal es el caso de Esporotricosis, Blastomycosis, Tuberculosis cutánea, Lepra, etc.

Los aspectos clínicos son muy polimorfos pero la mayor parte de las leishmaniasis tiene en común la capacidad de ulcerar la piel y las mucosas. Por

lo tanto, los métodos basados en la demostración del parásito proveniente de las lesiones sospechosas es concluyente. (Arenas R., 2005).

Respecto a los pasos que se deben seguir a la hora del diagnóstico son:

- 1) Clínico
- 2) Epidemiológico
- 3) Laboratorial

En el diagnóstico de Leishmaniasis la anamnesis es de extraordinaria importancia porque nos permite determinar si el caso es: sospechoso, probable o confirmado. (Arenas R., 2005).

Brevemente se hará una descripción de los métodos de laboratorio que se emplean en el diagnóstico de Leishmaniasis, los cuales pueden ser métodos directos o indirectos.

1. Métodos directos o parasitológicos.-

En el diagnóstico parasitológico directo hay dos alternativas de diagnóstico. 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.

Otro método empleado es la inoculación de animales de laboratorio (hámsters dorados) y ratones isogénicos y no isogénicos, a partir de los que se puede aislar y caracterizar a la *Leishmania* a través de PCR (reacción en cadena de la

polimerasa), anticuerpos monoclonales y/o electroforesis de isoenzimas. (Boelaert M., 1991).

a. Frotis de Lesión.-

Este método directo permite observar al microscopio amastigotes de *Leishmania* presentes en lesión, la sensibilidad varía según el tiempo de evolución y la forma clínica de la enfermedad. La muestra de lesión se obtiene mediante la escarificación de la superficie o del borde de la lesión, empleando bisturí o palillo de madera con un extremo en forma de bisel; la muestra se la extiende en un portaobjetos y se tiñe con colorantes panópticos (Giemsa o May Grünwald Giemsa), para su observación al microscopio óptico con objetivo de inmersión. (Fagundes A. ,1991).

La detección de parásitos en lesiones crónicas típicas de Leishmaniasis cutánea localizada es más difícil que en lesiones recientes, donde se observan una mayor cantidad de parásitos que hacen más fácil su diagnóstico. (Sosa L.F., 2010).



A. Escarificación del borde de la lesión

B. Aspirado de la lesión con jeringa

C. Extensión de la muestra en un porta objetos

FIGURA Nº 10 Toma de muestra de lesiones a pacientes con *Leishmania Cutánea* para diagnóstico de laboratorio por método del Frotis

Fuente propia

b. Cultivo de parásitos.-

La técnica de cultivo de parásitos de *Leishmania* es complementaria al diagnóstico directo de la enfermedad, ya que permite el aislamiento del parásito y facilita su detección. No existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. Por lo cual, los medios universalmente aceptados o más frecuentemente utilizados son los medios difásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN) y los medios líquidos para cultivo celular de insectos o mamíferos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con 10 al 30% de suero fetal bovino inactivado.

Un cuidado especial que debe tomarse en cuenta al utilizar medios enriquecidos con suero bovino fetal, es que debe efectuarse un ensayo previo del lote para comprobar si permite el crecimiento y multiplicación de los parásitos, puesto que está comprobado que algunos lotes presentan una notable citotoxicidad. De manera tal, sea cual sea el medio de cultivo a elegir, se le deben añadir antibióticos (estreptomicina, penicilina, ceftriaxona) para reducir las posibles contaminaciones. (Gallego M., 2008).

Esta técnica es empleada con mayor frecuencia para fines de investigación como tipificación de parásitos, pruebas *in vitro* para la obtención de nuevos agentes leishmanicidas o como fuente de antígeno para pruebas inmunológicas. (Sosa L.F., 2010)

i. Aislamiento primario de las lesiones cutáneas

La sensibilidad del método está directamente relacionada con la correcta selección que hagamos del medio más apropiado y con la habilidad del

investigador para escoger el lugar de la lesión que sea el de la mayor actividad parasitaria (la que sólo surge después de años de experiencia y práctica). Para la recolección de la muestra para el cultivo, se puede usar la técnica de aspiración de las lesiones por el procedimiento descrito por Hendricks 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, la sangre contiene proteínas séricas altamente inhibitorias para el crecimiento de los promastigotes de *Leishmania*. (Riera C., 2008).

ii. 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%, mientras que Dimier-David, en Bolivia, consiguió 23% de positividad en medio NNN complementado con Schneider y antibióticos. (Flisser A., 2006).

En la leishmaniasis, tanto cutánea como mucosa, el éxito en el aislamiento es inversamente proporcional al tiempo de duración de la enfermedad. Como ejemplo Pérez afirma que el diagnóstico de *Leishmania visceral* se consigue asociando tres métodos como ser: prueba de Montenegro, serología por ELISA y cultivo. De esta manera la sensibilidad del diagnóstico laboratorial de LV puede llegar al 90,0%. (Pérez R., 2006).

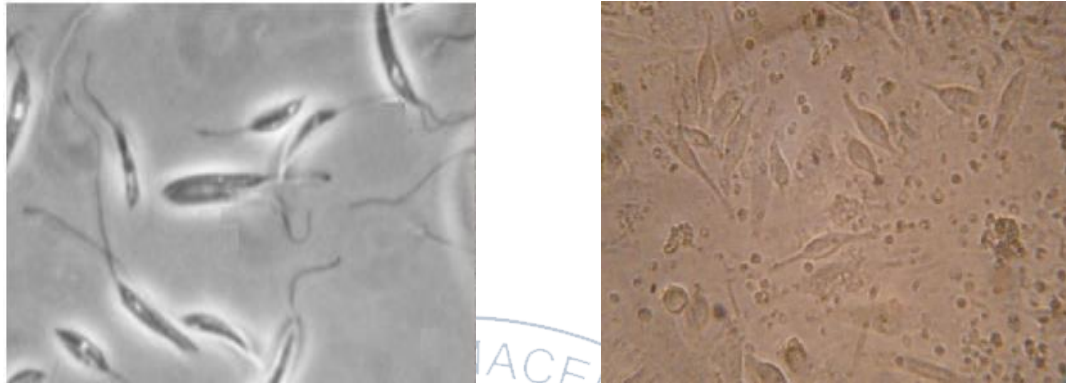


FIGURA N° 11 Observación microscópica de los promastigotes de *Leishmania braziliensis* en medio de cultivo Schneider (aumento 40x)

Fuente propia

c. Reacción en Cadena de la Polimerasa.-

La **reacción en cadena de la polimerasa** es una técnica cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. (Wortmann T., Hochberg L., 2011).

La Leishmaniasis puede ser identificada por la especie, la patogenicidad y los posibles métodos de control, por lo que evaluaron: Bonifas D., Sosa LF., en el 2011 tres procedimientos de extracción de ADN de *Leishmania* basándose en métodos de PCR.

A partir de frotis de lesión teñidos con Giemsa, a partir de frotis que contenían suspensiones con concentración conocida de promastigotes de *Leishmania braziliensis* teñidos con Giemsa y frotis de lesión de pacientes con leishmaniasis cutánea.

Los datos obtenidos de la PCR fueron comparados frente a los resultados de una PCR convencional y examen parasitológico directo. Los resultados muestran que obtener ADN a partir de frotis teñidos con Giemsa por el método SLPK es una buena alternativa al diagnóstico molecular de leishmaniasis y que además sería una herramienta útil para determinar polimorfismos genéticos del parásito. (Bonifaz D., Sosa LF., 2011).

d. **Real Time PCR.-**

Esta técnica permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m). (Bieche I., Parfait B., 2001).

Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en las técnicas basadas en sondas específicas.

En las técnicas basadas en fluorocromos el ADN, que se multiplica su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la **ventaja** de utilizar cebadores normales para su realización. Es mucho más económica que la que usa sondas específicas.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una *sonda* unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso, cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

El PCR en tiempo real monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre, esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación (termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. (Buffet P., Sulahian A., 2005).

Se utiliza el ensayo de PCR en tiempo real para la detección de complejos de *Leishmania* (*L. Viannia*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. infantum* y *L. major*) el cual fue desarrollado para detectar el gen glucosafosfato isomerasa y sacar provecho de variabilidad de la secuencia de ADN dentro de ese gen para *Leishmania*. Se utilizó un conjunto de cebador / sonda, y se probaron frente a un panel de 21 controles negativos conocidos y en ADN extraído a partir de promastigotes de cultivo o a partir de biopsias de tejido de pacientes con leishmaniasis cutánea. El ensayo fue altamente específico, como no se detectaron productos de amplificación en las muestras de control negativo, manteniendo al mismo tiempo un alto grado de precisión diagnóstica compleja-específica para organismos cultivados y muestras clínicas de pacientes. PCR en tiempo real ofrece la identificación rápida (en cuestión de horas) de *Leishmania* al nivel de complejo y proporciona una herramienta molecular útil para ayudar a las dos epidemiólogos y los clínicos. (Buffet P., Sulahian A., 2005).

e. **Citometría de flujo.-**

Es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores, y en la ingeniería de proteínas. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células. También permite el análisis multiparamétrico simultáneo de otras características físicas y químicas, evaluando en promedio más de dos mil partículas por segundo. (Michael W., 2005).

En ingeniería de proteínas, se utiliza la citometría de flujo en conjunción con técnicas de expresión en levaduras y expresión en bacterias, para identificar aquellas proteínas expresadas en la superficie celular que posean las características deseadas. (Pfaff A., 2005).

Goncalves R., en el 2005, propone un método de citometría de flujo para estudiar los macrófagos peritoneales *canina-Leishmania chagasi* interacción vinculante por un ensayo utilizando la estable intra-citoplasmática fluorocrome, 5,6-carboxyfluorescein diacetato succinimidyl ester (CFSE). Esta metodología es necesaria para calcular las tasas de parasitismo. Por otra parte esta técnica también permite la caracterización fenotípica de las células infectadas y la identificación de las moléculas de la superficie de la célula que participan en la captación de parásitos. Por último, este método permite el análisis de grandes

poblaciones de células más que el escaso número que se deben analizar usando microscopía. (Goncalves R., Vieira E., 2005).

2. 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, Inmunofluorescencia indirecta (IFI). (Alvar J., Molina R., 2004).

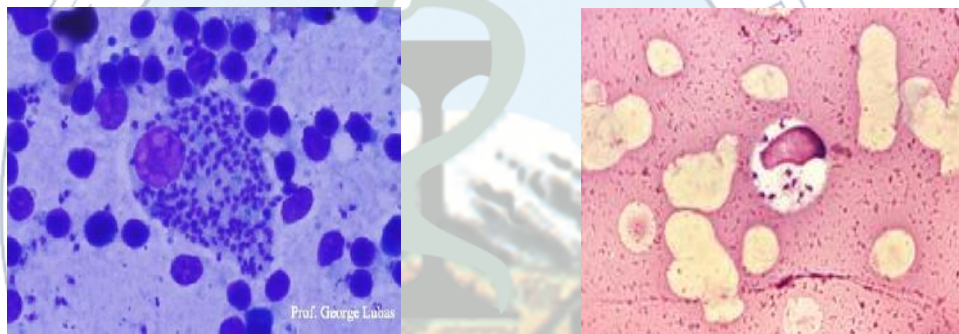


FIGURA Nº 12 Macrófago lleno de parásitos de *Leishmania*

Disponible en <http://grupo.leishmania.org/es>.

a. Intradermorreacción de Montenegro.-

Es una prueba complementaria pero no es prueba diagnóstica ya que en pacientes provenientes de zona con alta transmisión de leishmaniasis se presenta respuesta positiva, sin que necesariamente esto implique que padezca la enfermedad. En caso de observar la lesión de la mucosa una reacción de Montenegro positivo orienta para la realización de la biopsia y la remisión del paciente a nivel especializado. (San Andrés M., Tesouro M., 2004).

Es una reacción de hipersensibilidad retardada que evalúa la inmunidad mediada por células T. Consiste en la aplicación de un antígeno extracto soluble preparado

a partir de promastigotes procedentes de cultivo. Se aplica intradérmicamente 0,1 ml de antígeno de *leishmania* en la cara anterior del antebrazo izquierdo del paciente y se hace la lectura del diámetro de induración a las 48 a 72 horas. Se considera positiva si el diámetro 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. (Mollinedo S., Torrez M., 2000).

b. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La prueba ELISA es una técnica inmunoenzimática que permite detectar y cuantificar anticuerpos específicos contra *Leishmania*.

Las ventajas que posee el ELISA

- La lectura es objetiva porque se hace mediante un lector espectrofotométrico.
- El rango de sensibilidad del ELISA es amplio y permite discriminar también leves aumentos o disminuciones del nivel de anticuerpos.
- Utiliza antígenos purificados o recombinantes. (Nieto J., Vitutia M., 2004).

Los antígenos recombinantes, son antígenos utilizados para el diagnóstico de la enfermedad de Leishmania, los cuales son elaborados a partir de extracto de promastigote del parásito de Leishmania (enteros), que se caracterizan porque no dan reacciones cruzadas con otro tipo de enfermedades parasitarias porque se trata de fracciones semipurificadas. Estos antígenos recombinantes son

considerados como antígeno ideal, puesto que presenta una alta sensibilidad y especificidad. (Montoya Y., Padilla C. 1997).

c. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Esta prueba detecta anticuerpos anti-*Leishmania* circulantes en el suero del paciente a títulos bajos. En las lesiones ulceradas por *L. brasiliensis* la sensibilidad a la IFI está en torno del 70% dentro del primer año de iniciada la enfermedad.

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. (Sosa L.F., 2010).

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. (Fisa R, Riera C, 2001).

I. TRATAMIENTO.

Los medicamentos de primera línea para el tratamiento de las leishmaniasis según recomendados de la OPS/OMS corresponden a los antimoniales pentavalentes (Stibogluconato de sodio y Antimoniato de N. Metil-Glucamina).

La dosis debe ser calculada de acuerdo al peso del paciente y por un tiempo conforme a la forma clínica.

Los antimoniales pentavalentes se los debe utilizar únicamente en leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral sensibles al tratamiento, vale decir pacientes que no hayan recibido con anterioridad y tengan antecedentes de resistencia. (*Ministerio de Salud y Deportes. 2007*).

Dado que en casos de leishmaniasis cutánea y mucosa el tratamiento debe hacerse en forma ambulatoria, sistémica y prolongada, éste deberá efectuarse bajo supervisión del personal de los servicios de salud para garantizar la adherencia al tratamiento.

Es necesario valorar al paciente, tratando de detectar temprano una eventual hepatotoxicidad, nefrotoxicidad o cardiotoxicidad. Se aconseja la realización de un perfil hepático y renal en laboratorio y un electrocardiograma antes del tratamiento y cada 10 días durante el mismo, de esta manera se evitarán posibles accidentes mortales rara vez citados.

El personal de salud debe hacer comprender al paciente que el tratamiento debe realizarse imperiosamente para curarse de la enfermedad, así esté sea largo y doloroso por lo que es necesario motivar al mismo previendo y explicando los efectos secundarios y las posibles complicaciones.

Boelaert M., el 2001 recomendó que se debe realizar el seguimiento (post-tratamiento) 1, 2, 3, 6 meses y al año de concluido el tratamiento.

En la evaluación pre-tratamiento se debe medir el diámetro de cada ulcera, para lo cual es mas practico medir la longitud en milímetros de borde a borde (visible o palpable) en dos diámetros perpendiculares. El área en milímetros cuadrados (mm^2) se obtiene multiplicando estos dos diámetros. Si al final del tratamiento el área de la lesión es la mitad o menos del área inicial NO ES NECESARIO dar más tratamiento, así no haya cicatrizado la ulcera totalmente. Si en el control de

1 mes post-tratamiento el área de la lesión es la mitad o menos del área del control anterior NO ES NECESARIO dar más tratamiento, así no haya cerrado totalmente la lesión. Si en el control de 3 meses post-tratamiento la lesión continua activa (úlceras abiertas, placa infiltrada) deben hacerse nuevos exámenes. (Boelaert M., 2001).

1. Atención curativa de la Leishmaniasis.-

Comprende la administración oportuna y completa del tratamiento para la forma cutánea, mucocutánea y visceral.

El tratamiento tiene por objeto eliminar el parásito, evitar las complicaciones y mortalidad, logrando una recuperación precoz para reinserción del paciente a sus actividades cotidianas y coadyuvar al control de la transmisión de la enfermedad. Los objetivos del tratamiento son el control y eliminación del parasitismo, mejorar el cuadro clínico y evitar las complicaciones. (Fagundes A., 2001).

a. Administración del tratamiento.-

El tratamiento será administrado en los servicios de salud y está bajo la responsabilidad de personal médico, enfermera o el personal de salud que cumpla estas funciones en los diferentes niveles de atención.

Tratamiento supervisado ambulatorio, consiste en:

- 1) Información sobre los efectos y riesgos de abandono del tratamiento.
- 2) Aplicación parenteral de la droga antileishmaniásica en forma diaria y en condiciones de bioseguridad adecuados.

- 3) Evaluación clínica una vez por semana, a fin de verificar el cumplimiento del tratamiento a la dosis indicada, respuesta al tratamiento y proporcionar orientaciones complementarias sobre prevención de la enfermedad.
- 4) Visita domiciliaria dentro de la primera semana de iniciado el tratamiento. *(Aliaga L., 2001).*

b. Medidas generales

Dependiendo de la magnitud y severidad de la lesión se aplicaran medidas generales que permitan coadyuvar en la mejoría y eviten complicaciones.

- En lesiones de piel realizar limpieza con abundante agua y antisépticos yodóforos o clorhexidina mientras exista secreción serosa o purulenta. Drenajes si hubiera lesiones con abscesos. *(Boelaert M., 2001).*

Es importante recordar que iniciado el tratamiento de no mediar una contraindicación específica, debe completarse la dosis por el tiempo indicado según cada caso, para lo cual deberá garantizarse la disponibilidad de medicamentos.

Cada nuevo caso confirmado de leishmaniasis debe ser informado y reportado al Sistema de Vigilancia Epidemiológica. *(Boelaert M., 2001).*

c. Procedimientos previos al tratamiento

- Hemograma
- Pruebas de función hepática
- Prueba de función renal

- Electrocardiograma
- Coproparasitológico seriado
- Exámen general de orina
- Prueba de embarazo

En el hemograma en caso de baja de glóbulos rojos y alteraciones de la serie blanca se procederá previamente a estabilizar y/o corregir esta situación debido a la incompatibilidad con el tratamiento.

En el coproparasitológico seriado habiéndose establecido que algunos parásitos (Giardia lamblia, amebas) pueden producir inmunosupresión, estableciéndose como prioridad realizar tratamiento antiparasitario previo al inicio del tratamiento con el Glucantime.

El exámen general de orina es para descartar infecciones urinarias bajas y/o altas y otras alteraciones. (Gallego M., 2008).

No se realizará tratamiento antileishmania por ningún motivo en pacientes gestantes, en cualquier periodo del embarazo, ni a madres que estén dando de lactar. El Glucantime puede ocasionar interrupción del embarazo en el primer trimestre y amenaza de parto prematuro en el resto del embarazo, además del riesgo teratogénico.

No se utilizará estos medicamentos antileishmaniásicos durante la lactancia porque el medicamento estaría presente en la leche materna, existiendo el riesgo de efectos colaterales y adversos en el niño. Es por esta razón que se debe realizar una planificación familiar mientras dure el tratamiento.

En caso de presentarse lesiones en mujeres embarazadas se debe usar calor local (compresas calientes sin sensación de quemadura durante 5 minutos tres veces al día) y esperar hasta después del parto para iniciar el tratamiento. (Riera C., 2008).

i. Efectos secundarios al tratamiento leishmanicida

Los más frecuentes con náuseas, vómitos, diarrea severa, anorexia, letargo, cefalea, malestar general, mialgias, artralgias, erupciones cutáneas, prurito.

ii. En caso de sobredosis

Se recomienda agentes quelantes DIMERCAPROL 200 mg IM cada 6 horas o DMSA (Acido 2,3 dimercaptosuccinico). (Gallego M., Riera C., 2008).

Las acciones farmacológicas del **dimercaprol** son el resultado de la formación de complejos de quelación entre sus grupos sulfhidrilo y los metales. Con metales como el mercurio, el oro y el arsénico la combinación debe poseer una elevada estabilidad para que puedan ser excretados fácilmente. De manera adicional, los enlaces sulfuro-metal de los compuestos deben ser lábiles en la orina tubular ácida para evitar la toxicidad al riñón.

El dimercaprol puede llegar a causar anemia hemolítica en pacientes que son deficientes de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD). El fármaco deberá evitarse en personas con insuficiencia hepática a menos que ésta sea resultado de un envenenamiento por la presencia de plomo. (Peters R., Stocken L., 2007).

Los grupos sulfhidrilos del **DMSA** forman complejos de anillos heterocíclicos con los metales pesados evitando de este modo su unión a los ligandos endógenos del cuerpo.

Este medicamento se excreta por vía urinaria y heces fecales, se contraindica en el envenenamiento por cadmio porque puede precipitar nefrotoxicidad. No puede usarse tampoco en envenenamiento por arsina (hidruro de arsénico, AsH_3) ya que no posee efectos sobre la hemólisis ni sobre la función renal malograda. En la intoxicación por uranio, selenio e hierro deberá evitarse el uso del ácido dimercaptosuccínico ya que forma complejos con mayor toxicidad que los metales mismos. Las personas que toman hierro como complemento deben dejar de tomarlo, y tras la terapéutica, retrasar la ingesta hasta por 24 horas. Si la concentración de plomo en sangre es mayor a 70 mg/dL, debe tratarse con $CaNa_2EDTA$.

A las personas que puedan presentar hipersensibilidad al fármaco se deberá retirar el medicamento. (Fernández J., Matesanz J., 2007).

2. Antimoniales pentavalentes.-

- Para las Leishmaniosis cutáneas el tratamiento de elección son los antimoniales pentavalentes. Se utiliza el antimonio de meglumina a dosis de 10-20 mg/kg. por vía intramuscular durante 20 días.
- Si hay pocas úlceras pueden ser útiles las aplicaciones intralesionales
- Las recidivas no son infrecuentes siendo necesario volver a repetir el tratamiento en intervalos de 15 días.

- Si la respuesta no es buena es necesario derivar el caso a un Centro de referencia donde se utilizará la Pentamidina o la Anfotericina B. (*Riera C., Valladares J., 1999*).

En Bolivia se inicia la terapia los tres primeros días con una dosis de 25%, 50% y 75% respectivamente hasta el día 4 en el que se suministra la dosis total diaria recomendada continuándola hasta concluir el tratamiento (20 días cutánea y 30 días mucosa).

a. Mecanismo de acción

El Glucantime inhibe la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos, reduciendo de esta manera la formación de ATP. (*Gallego M., Aisa M., 1999*).

b. Farmacocinética

El Glucantime mantiene una concentración elevada a las 2 horas de la administración y más del 80% de lo administrado por vía muscular y el 95% por vía endovenosa se excreta por vía renal hasta las 6 horas. Su utilización exclusivamente parenteral y su toxicidad condicionan una delicada utilización del producto en zonas geográficas donde la cobertura médica es insuficiente.

Se puede realizar tratamientos locales o intralesionales conjuntamente el tratamiento sistémico pero de elección se debe optar siempre el tratamiento sistémico como primera opción. (*Fisa R., Ribas N., 1999*).



FIGURA Nº 13 Administración de Antimoniales pentavalentes

Gentileza Dr. Rolando Parra (Palos Blancos – La Paz – Bolivia) Proyecto O.S.C.A.R.

c. 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. *(Carrio J., Alberola J., 1999).*

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. *(Riera C., Valladares J., 1999).*

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 cardiaca.

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.

La Anfotericina está contraindicada en gestantes, cardiopatías, neuropatías y hepatopatías. (Ministerio de Salud y Deportes. 2007).

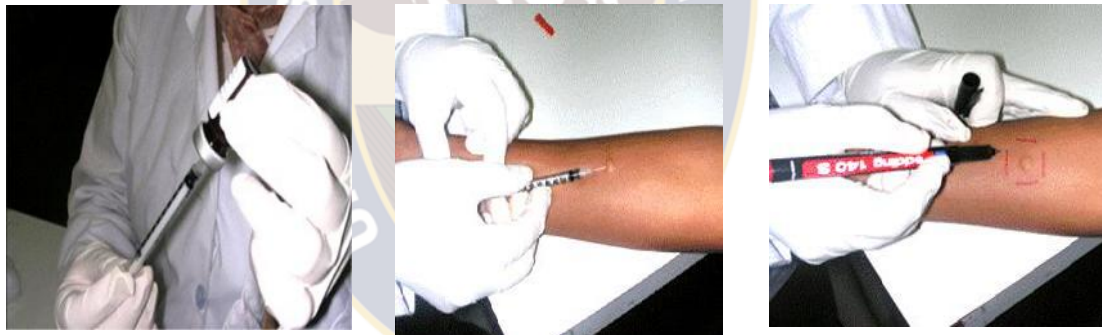


FIGURA Nº 14 Administración de Anfotericina “B”
Gentileza Dr. Rolando Parra (Palos Blancos – La Paz – Bolivia) Proyecto O.S.C.A.R.

3. Evanta

La especie *Galipea longiflora* (Evanta) es una planta medicinal de uso tradicional que se emplea para el tratamiento de Leishmaniasis.

En el caso de lesiones cutáneas causadas por *Leishmania*, primero se pulveriza la corteza del tronco, la raíz y las hojas de la Evanta; luego este polvo se aplica como cataplasma en las úlceras, repitiendo dos veces al día. También, se recomienda tomar una infusión de la corteza en agua caliente dos veces al día por el periodo de tres días seguidos. (Fournet A., Bourdy G. 2000)

En la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, existe el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), el cual ha desarrollado estudios químicos y biológicos del género *Galipea longiflora*, estas investigaciones muestran un alto contenido de alcaloides quinolínicos como el 2-aril, 2-alkil quinolínicos (obteniendo aproximadamente 13 componentes). De estos componentes los más importantes son los alcaloides: chimanina A, B, C y D, los cuales fueron aislados de las hojas y mostraron actividad leishmanicida *in vitro* contra cepas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* en sus formas promastigotes. También, en ratones con lesiones cutáneas causadas por *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*, tratados con chimanina A y C por vía oral durante dos semanas a una dosis de 100 mg/kg/día mostraron la misma eficacia que Glucantime, observándose una reducción en el tamaño de la lesión y en el número de parásitos” (Giménez A., Quenevo C. 2000).

“La actividad leishmanicida de los alcaloides quinolínicos aislados de la hojas de *Galipea longiflora* fueron evaluados a través de la enzima APRT (adenina fosforribosil transferasa) de *Leishmania*, los cuales mostraron una inhibición enzimática entre 5,6 y 41,9% a concentraciones de 50 y 25 ug/mL”. (Andrade M. 2003).

III. ANTECEDENTES

En nuestro medio de manera rutinaria para el diagnóstico por laboratorio de leishmaniasis se utiliza la observación parasitológica directa mediante frotis de lesión teñidos con Giemsa, algunos especialistas para aumentar la sensibilidad y especificidad del método de diagnóstico también se suele requerir determinar los niveles de anticuerpos anti *Leishmania* por los métodos de ELISA y/o IFI. Son muchos los investigados que han sugerido que el seguimiento de los niveles de

anticuerpos IgG e IgE son importantes para predecir el éxito del tratamiento y la cura de la enfermedad. (Sosa L., 2010)

Entre otros estudios se destaca a Khairul A., et al 1999 quienes en un estudio realizado en humanos analizaron las clases específicas de inmunoglobulinas que se produce frente a antígenos de *Leishmania* en pacientes con Leishmaniasis Visceral, en ese estudio revelaron la elevación de las clases de anticuerpos IgG, IgM, e IgE, de las cuales las subclases IgG3 fueron asociadas específicamente a esta enfermedad. En este estudio, divulgaron los isotipos específicos de inmunoglobulinas y subclases de IgG en los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral durante la enfermedad activa, resistencia al tratamiento y curación de la enfermedad, por lo que se establecerán una correlación de estos isotipos, sus niveles en la sangre con la progresión y resolución de la infección. (Abbas A., 1996).

Por otra parte, observaron disminuciones significativas de todas las subclases de IgG en pacientes después del tratamiento con Anfotericina. Debido a que la IgG1 e IgG3 tienen la mayor capacidad de fijar complemento en seres humanos y mediar reacciones inflamatorias, mediadas por respuesta inmune Th1. Observaron además que, un nivel constante de IgM, IgE, e IgG4 después del fracaso terapéutico puede ser correlacionado con la persistencia de la enfermedad durante recaída clínica y la resolución de la infección corresponde a una declinación de IgE y de IgG4, los cuales ayudan en la patogénesis de *Leishmaniasis Visceral* y su regulación en el control de la enfermedad. (Abbas A., 1996 - Afrin F., 1997).

La determinación de la Inmunoglobulina IgG es de suma importancia en pacientes con *Leishmania*, puesto que es la que participan como efectores de la

Respuesta Inmune, junto con los eosinófilos. (*Galaktionov VG., Chmielewski M., 2004*).



IV. JUSTIFICACIÓN

La alta incidencia de leishmaniasis en áreas tropicales y sub-tropicales del país se debe fundamentalmente al crecimiento de las comunidades rurales y la necesidad de colonizar nuevos territorios selváticos para diversos fines. Esto a su vez repercute a que el área endémica de la leishmaniasis en Bolivia se extienda cada vez más, haciendo complicada la cobertura y control por parte de los centros de salud o postas sanitarias de estos centros urbanos.

Otra causa importante que influye el aumento de la incidencia de leishmaniasis en nuestra población es la falta de acceso a la medicación para el tratamiento, ya sea por el alto costo o por la falta de disponibilidad de los mismos en los centros de salud de las comunidades en las que la enfermedad es endémica. Por otra parte, la elevada toxicidad de los medicamentos de uso convencional ha motivado la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que tengan mayor eficacia y menor toxicidad en el tratamiento de esta enfermedad.

Debido a que en pacientes tratados contra la leishmaniasis por cualquier tipo de tratamiento utilizado se consigue la cicatrización de la lesión pudiendo inferir de esta manera una cura clínica pero no así una cura parasitológica, se hace necesario buscar e identificar nuevas herramientas de diagnóstico y seguimiento que nos permitan determinar si un paciente efectivamente resolvió la enfermedad. Es así que en base a los antecedentes planteados por otros investigadores en los que se propone la determinación de los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE como una alternativa para demostrar que el paciente hizo cura clínica y parasitológica de la enfermedad, en el presente trabajo se pretende confirmar si los niveles de anticuerpos IgG e IgE tienen un valor diagnóstico en la determinación de la resolución clínica y laboratorial de la enfermedad.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación de los niveles de anticuerpos por IFI y ELISA se ha constituido en una herramienta laboratorial de apoyo, para determinar de manera indirecta la resolución de cura de una determinada patología. Es así que en la actualidad se puede encontrar kits comerciales que determinan los niveles de anticuerpos IgG específicos contra *Leishmania*, los cuales permiten monitorear la administración de una terapia específica, corroborar una posible resistencia al tratamiento o falla terapéutica.

Se ha demostrado también, que además de los anticuerpos IgG, los anticuerpos de tipo IgE específicos para *Leishmania* son un aporte valioso para el seguimiento de la enfermedad. Bajo esta premisa en el Instituto de Servicios de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), se optimizó y validó dos test de ELISA que determinan respectivamente los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-*Leishmania*. Por lo antes expuesto en el presente trabajo nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿En los casos en que los pacientes que reciben tratamiento leishmanicida y hacen una cura clínica (resolución de la lesión), los niveles de anticuerpos IgG e IgE en sangre periférica estarán directamente relacionados con la cura clínica de la enfermedad?

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar el valor pronóstico de la medición de los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-*Leishmania* antes y después del tratamiento leishmanicida.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar el grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE con el éxito o fracaso de tres tipos de tratamiento leishmanicida.
- ✓ Determinar cuál es el tipo de anticuerpo que tiende a presentar una mayor disminución en casos de cura clínica de la leishmaniasis.
- ✓ Correlacionar los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con los resultados de las pruebas de ELISA que determinan anticuerpos IgG e IgE contra *Leishmania*.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

A. Tipo de estudio.-

El presente trabajo de investigación corresponde a un estudio transversal descriptivo.

B. Población en estudio.-

La población en estudio estaba conformada por 80 muestras de suero de pacientes de los cuales 60 correspondían a pacientes con leishmaniasis confirmada por clínica y frotis positivo y 20 correspondían a pacientes negativos para leishmaniasis, los cuales se utilizaron como controles sin la enfermedad.

C. Descripción de la muestra .-

1. Tamaño de la muestra.-

El tamaño de la muestra fue definido por conveniencia y estaba formado por 80 muestras de sangre periférica divididas en dos grupos (grupos 1 y 2).

a. Grupo N° 1

Estaba conformado por muestras de sangre periférica de 60 pacientes que estaban cursando leishmaniasis y que no habían recibido tratamiento leishmanicida previo, que asistieron entre los meses de mayo del 2011 a diciembre de 2012 al laboratorio de Parasitología del INLASA o por pacientes que asistieron al laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS o finalmente

pacientes que asistieron al laboratorio del Hospital General de la localidad de Alto Beni Palos Blancos.

b. Grupo N° 2

La población control del estudio estaba conformada por muestras de sangre periférica de 20 individuos que no tenían antecedentes de haber estado en zona endémica de la enfermedad y que habían dado resultado negativo para leishmaniasis por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

c. Criterios de inclusión para el grupo N° 1

Se incluyeron las muestras de los pacientes comprendidos entre los 18 y 55 años que estaban cursando leishmaniasis, que no han recibido tratamiento previo leishmanicida.

d. Criterios de inclusión para el grupo N° 2

Se incluyeron las muestras de los pacientes comprendidos entre los 18 y 55 años que no estaban cursando por ningún tipo de leishmaniasis y que no presentaron antecedentes de haber estado en zona endémica para la enfermedad en el último año.

e. Criterios de exclusión para los grupos 1 y 2

Se excluyeron las muestras de los pacientes que presentaron las siguientes características:

- Personas que estaban cursando una infección parasitaria concomitante.
- Pacientes menores a 18 y mayores a 55 años.
- Mujeres embarazadas
- Personas con antecedentes de Chagas, Sífilis y reacciones de hipersensibilidad.

2. **Sueros Control Positivo**

Se incluyeron las muestras de pacientes comprendidos entre los 18 a 55 años de edad que cursaron Leishmaniasis, que habían sido confirmados por clínica y laboratorio y que no recibieron tratamiento previo leishmaníada. Las muestras fueron donadas bajo codificación por el laboratorio de Parasitología de INLASA, sueros que además habían sido confirmados como positivos por frotis, IFI y ELISA.

3. **Sueros Control Negativo**

Se incluyeron muestras de pacientes comprendidos entre los 18 a 55 años de edad que no cursaron por ningún tipo de Leishmaniasis, serología negativa por IFI, sin evidencia de cicatriz o lesión (daño o alteración, orgánica o funcional de los tejidos) y que no habían estado en zonas endémicas.

D. **Análisis de las muestras**

Los pacientes recibieron diferentes esquemas de tratamiento los cuales se detallan a continuación:

1. Pacientes tratados con Evanta

El tratamiento con Evanta fue realizado durante 60 días, consistía en la aplicación tópica de cremas al 5% en el lugar de la lesión cutánea y la administración por vía oral del jarabe (5%), 10 mL una vez al día.

Los pacientes que recibieron tratamiento con Evanta fueron 23 (38%). De cada paciente se obtuvieron 4 muestras de sangre periférica tomadas bajo las siguientes condiciones:

- (T0) Primera muestra antes del tratamiento
- (T1) Segunda muestra a los 30 días de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 60 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 90 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.

2. Pacientes tratados con Glucantime

El tratamiento con Glucantime se realizó durante 20 días, consistía en una aplicación diaria del inyectable (IM) a una concentración de 20 mg/Kg/día. Es importante mencionar que este tratamiento fue supervisado y bajo la responsabilidad del personal en salud.

Los pacientes que recibieron tratamiento con Glucantime fueron 34 (57%) de los cuales se obtuvo 3 muestras de sangre periférica tomadas bajo las siguientes condiciones:

- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 20 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T2) Última muestra a los 40 días, es decir 20 días después de haber concluido con el tratamiento.

3. **Pacientes tratados con Anfotericina B**

El tratamiento con Anfotericina "B" se realizó durante 4 meses (120 días), consistía en la aplicación de 0,5 mg/kg/día y se aumentaba gradualmente hasta 1 mg/kg/día en días alternos, sin sobrepasar la dosis de 50 mg por día. La Anfotericina B se administra por vía IV diluida en 500 mL de dextrosa al 5%. También, este tratamiento fue supervisado y bajo la responsabilidad del personal en salud.

Los pacientes que recibieron tratamiento con Anfotericina B durante 1 periodo del estudio fueron 3 (5%) de los cuales se obtuvo 4 muestras de sangre periférica.

- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 2 meses (60 días) de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 4 meses (120 días) de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 150 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.

E. Aspectos Éticos

Todos los individuos que formaron parte del presente estudio fueron informados acerca de los objetivos, el alcance, así como también de las posibles complicaciones que puedan resultar de la toma de muestra, para lo cual se obtuvo su consentimiento informado.

Para proteger la identidad de los pacientes; el INLASA entregó las muestras bajo codificación, por lo cual no se conoce el nombre ni la edad exacta del paciente, tampoco la procedencia. El resto de los pacientes atendidos en el Hospital General Alto Beni Palos Blancos y del Instituto SELADIS, dieron su consentimiento informado (que se detalla a continuación) para participar en el estudio y fueron beneficiados de manera gratuita con los resultados de los análisis de IFI y ELISA que detectan anticuerpos anti-*Leishmania*.

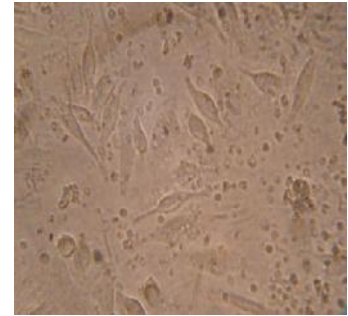
VIII. CONTEXTO Y LUGAR

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

C. Métodos.-

1. Cultivo de Parásitos

Los promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) que se utilizaron en el presente estudio fueron donados por el Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas al laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS. Los cuales fueron cultivados a 26°C en medio de cultivo Schneider suplementado con antibióticos (ver anexos) en estufa con 5% CO₂ y 99% de humedad relativa. Se hicieron “pases” o cambios de medio cada 72 horas. Para la preparación de antígenos los promastigotes fueron cosechados durante la fase estacionaria de crecimiento. El manejo de los promastigotes se realizó siguiendo todas las normas de bioseguridad recomendadas para el trabajo con patógenos bajo la protección de la campana de flujo laminar con excepción de la centrifugación.



- A. Manipulación de Promastigotes de *Leishmania braziliensis* en campana de flujo laminar
- B. Promastigotes de *Leishmania braziliensis* cultivados en estufa a 26°C.
- C. Observación al microscopio invertido de contrastes de fases, de los Promastigotes de *Leishmania braziliensis* con aumento de 40x

FIGURA Nº 15 Manipulación y cultivo de promastigotes de *Leishmania braziliensis* siguiendo normas de bioseguridad

Fuente propia

2. Preparación de las placas de microtitulación de ELISA con ASL.

Para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante la técnica de ELISA indirecto se evaluaron protocolos de tapizado y pos-tapizado, los cuales se desarrollaron de la siguiente manera:

Las placas de ELISA de 96 pozos de fondo plano Greiner bio-one (CELLSTAR), fueron tapizadas con 100 uL por pozo de Antígeno Soluble de *Leishmania* (ASL) a una concentración de 10 ug/mL para ELISA IgG y 20 ug/mL para ELISA IgE en Tampón Carbonatos 0,1 M pH 9,6 (ver anexos).

Luego, se incubó por 30 minutos en agitación suave a 250 rpm. Posteriormente, para que los antígenos se fijen adecuadamente a los pocillos, se incubó a 4°C durante toda la noche. Luego de incubar a 4°C, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% (ver anexos) con el fin de eliminar los antígenos que no

se fijaron al soporte. Después, se añadió 200 uL de una solución de bloqueo (PBS – BSA 0,1 %) y se dejó en incubación a 37°C por 2 horas lo cual nos permitía tapizar las zonas del micropozo que no habían sido recubiertas por el antígeno, evitando de esta manera absorciones inespecíficas de las inmunoglobulinas a evaluar.

Finalmente, para eliminar los excedentes de la solución bloqueante se procedió a lavar los pozos como ya se mencionó y se procedió a guardar las placas con perlas de silicagel para protegerlos de la humedad y dentro de bolsas de cierre hermético a - 4°C hasta el momento de su utilización.

3. Determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgE-anti *Leishmania* en los pacientes en estudio.

Se utilizó los protocolos de ELISA estandarizados por Choquehuanca et al., protocolos que de manera breve se describen a continuación:

a. Realización de la técnica de ELISA indirecto para medir niveles de Anticuerpos IgG anti-*Leishmania*.

Se realizaron diluciones (1/21) de los sueros problema o control en PBS -Tween 20 - BSA 0,1%. De las diluciones se añadieron 100 uL por pocillo, dejándose en incubación a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Para eliminar anticuerpos no específicos y otros interferentes presentes en el suero, se lavaron las placas 3 veces con 300 uL de PBS-Tween 20 al 0,05% (Buffer de lavado), desechándose la solución por inversión sobre un recipiente con hipoclorito al 0,8% y luego se secó la placa sobre papel absorbente.



FIGURA N° 16 Procedimiento de lavado de las placas de ELISA

Fuente propia

- i. **Preparación del conjugado anti IgG humano conjugado con peroxidasa:** se realizaron dos diluciones del conjugado 1/100 y 1/500 del anticuerpo anti-IgG y anticuerpo anti IgE humano respectivamente, ambos anticuerpos estaban conjugados con peroxidasa de rábano picante en PBS-Tween 20 – BSA al 0,1%. Luego, se añadieron 100 uL de estas diluciones por pocillo, se dejó en incubación a 37° durante 1 hora. Después se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05% para eliminar el conjugado que no había reaccionado.
- ii. **Preparación del sustrato:** se preparó una solución de orto-fenil-diamina (OPD) en tampón citrato-fosfato 0,05 M a pH 5 (ver anexos), de la cual se añadieron 100 uL por pocillo y se dejó en incubación a 37°C por 30 minutos. Pasado este tiempo se paró la reacción mediante la adición de 50 uL de Ácido Sulfúrico 3N por pocillo y se realizó la lectura de las densidades ópticas a 490 – 630 nm de longitud de onda en el lector de ELISA. La lectura se realizó dentro los primeros 30 minutos de realizada la prueba.

b. Realización de la técnica de ELISA indirecto para medir niveles de Anticuerpos IgE anti-*Leishmania*.

Precipitación de anticuerpos tipo IgG (PRE-TRATAMIENTO): antes del desarrollo de la técnica de ELISA, se realizó un pre-tratamiento a los sueros en estudio con el objetivo de eliminar la competencia por el sitio activo del determinante antigénico por parte de las inmunoglobulinas de tipo IgG.

Se preparó una dilución stock de anticuerpos anti-IgG humano (SIGMA Aldrich) a una dilución de 1/500 (indicada por la casa comercial) se usó como diluyente solución salina fisiológica (SSF). En tubos Eppendorf de 1,5 mL se depositaron 200 uL de los sueros problema a los cuales se añadieron 25 uL de la solución de anticuerpos anti-IgG humano, se mezcló bien en vórtex y se dejó en incubación por 1 hora a 37°C en agitación suave a 250 rpm.

Después de este periodo, a los 200 uL de muestra tratada se añadieron 160 uL de SSF y 60 uL de Polietilenglicol (PEG) al 12,5%, se mezcló bien y se dejó en incubación por 30 minutos a 37°C, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 15 minutos y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. El precipitado obtenido en el paso anterior correspondía a complejos inmunes IgG-anti IgG precipitados por acción del PEG.

A partir de las muestras tratadas se realizó la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgE anti-*Leishmania*. Tal como se describió en el punto 3.a.

Es importante mencionar que para la determinación de los dos tipos de anticuerpos (IgE e IgG) mediante la técnica de ELISA, la concentración de los reactantes y los tiempos de incubación fueron los mismos. Es decir, 100 uL por

pocillo de los sueros problema o control diluidos en PBS-Tween 20 BSA 0,1% dejándose en incubación a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Luego, 100 uL del conjugado con peroxidasa de rábano picante dejándose en incubación a 37° durante 1 hora y finalmente 100 uL por pocillo de orto-fenil-diamina (OPD) en tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5 y se dejó en incubación a 37°C por 30 minutos.

c. Preparación de improntas para Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Se cosecharon los parásitos en fase estacionaria de crecimiento, para lo cual se recuperó el contenido de una caja de cultivo en un tubo Falcón de 15 ml utilizando pipetas Pasteur con filtro. Posteriormente, se realizó una dilución 1/10 con formol al 1%, luego se procedió a realizar 3 lavados enrazando con PBS celular hasta un volumen de 12 ml, luego se realizó un dilución 1/10 con Solución Salina Fisiológica.



A. Obtención de promastigotes en fase estacionaria de crecimiento en la campana de flujo laminar



B. Precipitado en el que se encuentran los promastigotes después de los lavados con PBS, al cual se debe multiplicar por el factor de 10^5

FIGURA N° 17 Pre-tratamiento de promastigotes de *Leishmania braziliensis* para la preparación de improntas para IFI

Fuente propia

Hecho esto, se realizó un ajuste celular a una concentración de $3,0 \times 10^6$ parásitos/mL.

Luego, se procedió a sembrar 5 uL de los parásitos ajustados en cada pozo (en la placa de IFI). Finalmente se agitó suavemente durante 10 minutos para la precipitación, secado de las placas y finalmente el almacenaje a -20°C (para una mejor fijación del antígeno al vidrio) hasta el momento de su utilización.

d. Realización de IFI para medir títulos de Anticuerpos anti-*Leishmania*.

Una vez realizadas las improntas se procedió a realizar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, para lo cual se utilizó como diluyente la solución de PBS 0,01 M, pH 7.2 (PBS-IFI 1X), glicerina tamponada (ver anexos) y el conjugado anti IgG humana - FITC del kit comercial (Orgentec).

Se sembró 30 uL de las diluciones de los sueros en las improntas para IFI, luego se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se lavó las placas con Solución PBS - IFI 1X, teniendo cuidado de no contaminar o arrastrar muestra de un pozo a otro. Luego, se colocó la placa de IFI en una caja Coplin con Solución PBS – IFI 1X, en agitación suave durante 10 minutos a temperatura ambiente.



FIGURA N° 18 Procedimiento de la técnica de IFI; a) Sembrado de 30 uL en las placas; b) Lavado de las placas; c) Caja Coplin en agitación *Fuente propia*

Posteriormente se secó la placa con papel filtro, se colocó 1 gota del conjugado y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda cubriendo de la luz. Después se lavó con Solución PBS – IFI 1X como antes se describió. Y finalmente se secó la placa, se colocó el medio de montaje (glicerina tamponada) y cubreobjetos sobre la placa para proceder a la lectura en el microscopio de luz ultravioleta.

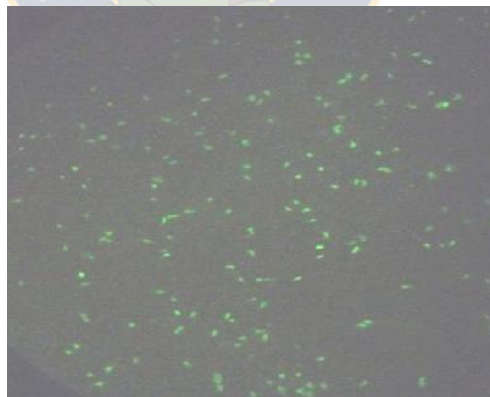


FIGURA N° 19 Promastigotes observados en microscopio luz ultravioleta/visible con aumento de 40x. *Fuente propia*

D. Interpretación de resultados.-

1. Determinación de anticuerpos anti-*Leishmania* IgE e IgG por ELISA indirecto

- Valores menores o iguales a 0.90, se consideran negativos para anticuerpos Anti - *Leishmania*
- Valores entre 0.91-1.09, encuentran en el límite.
- Valores mayores a 1.10. Son positivos para anticuerpos Anti- *Leishmania*.

2. Anticuerpos contra *Leishmania s.p.* (IFI – Leishmaniasis, sustrato promastigotes *L. braziliensis*)

- Para Leishmaniasis cutánea y mucocutánea se considera reactivo cuando existe fluorescencia a títulos mayores o iguales a 1/16.
- Se consideran muestras reactivas para Leishmaniasis cutánea y mucocutánea cuando hay fluorescencia, el parásito presenta una coloración verde hasta el título más alto.
- Para Leishmaniasis cutánea y mucocutánea se considera NEGATIVO cuando no hay fluorescencia, el parásito presenta una coloración rojiza.
- La sensibilidad para la prueba de IFI contra promastigotes de *Leishmania sp.* Varía del 66,6% al 82%.

- Se debe tomar en cuenta que puede haber reactividad cruzada a títulos bajos en casos de enfermedad de Chagas, lupus eritematoso sistémico, malaria, toxoplasmosis, amebiasis, paracoccidiomicosis e incluso con tuberculosis pulmonar.



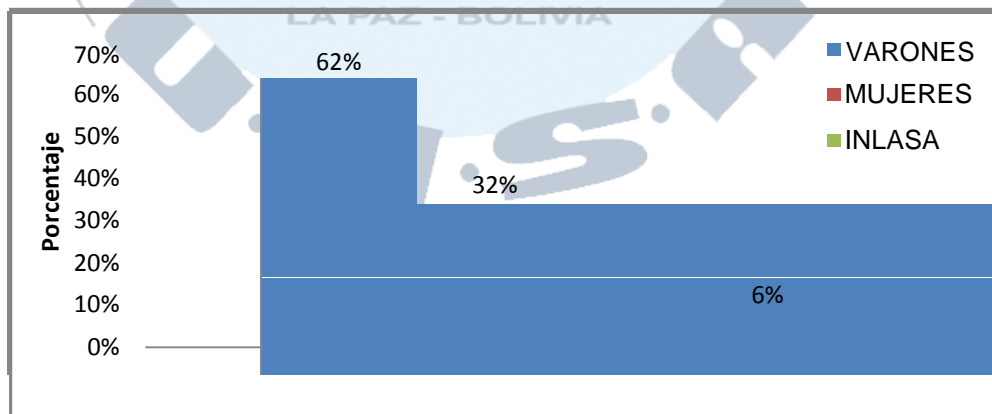
IX. RESULTADOS

En el presente estudio se determinó el valor pronóstico de los niveles de anticuerpos IgE e IgG anti-*Leishmania* por ELISA indirecto con antígenos solubles de *Leishmania braziliensis* y anticuerpos IgG contra promastigotes de *Leishmania braziliensis* por Inmunofluorescencia indirecta. Esto se realizó con la finalidad de cumplir con los objetivos planteados, para lo cual se identificó el grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE con el éxito o fracaso de tres tipos de tratamiento leishmanicida.

1. Clasificación de los pacientes involucrados en el estudio según sexo.

En la Gráfica N° 1 se observa que de los 60 pacientes analizados: 37 pacientes (62%) eran varones, 19 pacientes (32%) eran mujeres, 4 pacientes (6%) provenientes del INLASA (no reportaban este dato).

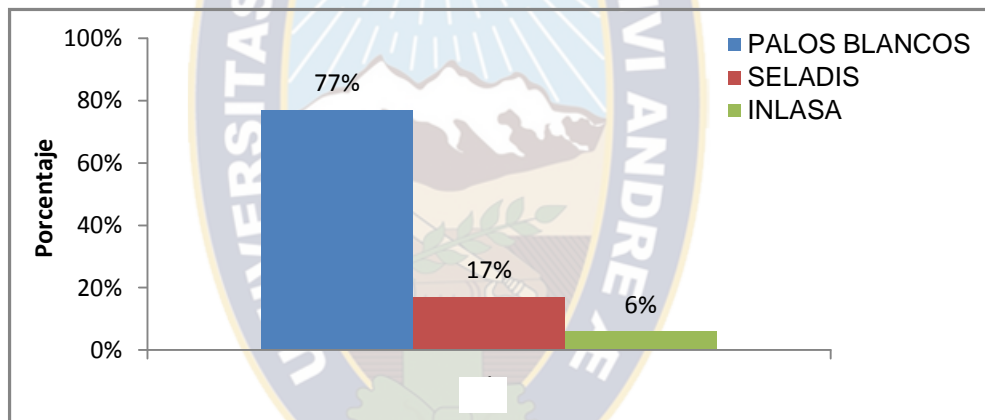
GRÁFICA N° 1 Clasificación de los pacientes con leishmaniasis involucrados en el presente estudio según sexo.



2. Clasificación de los pacientes involucrados en el presente estudio según procedencia.

En la Gráfica N° 2 se observa que de los 60 pacientes analizados: 46 pacientes (77%) provenían de Palos Blancos, 10 pacientes (17%) asistieron al laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS, 4 pacientes (6%) provenientes del INLASA.

GRÁFICA N° 2 Clasificación de los pacientes con leishmaniasis involucrados en el estudio según su procedencia.



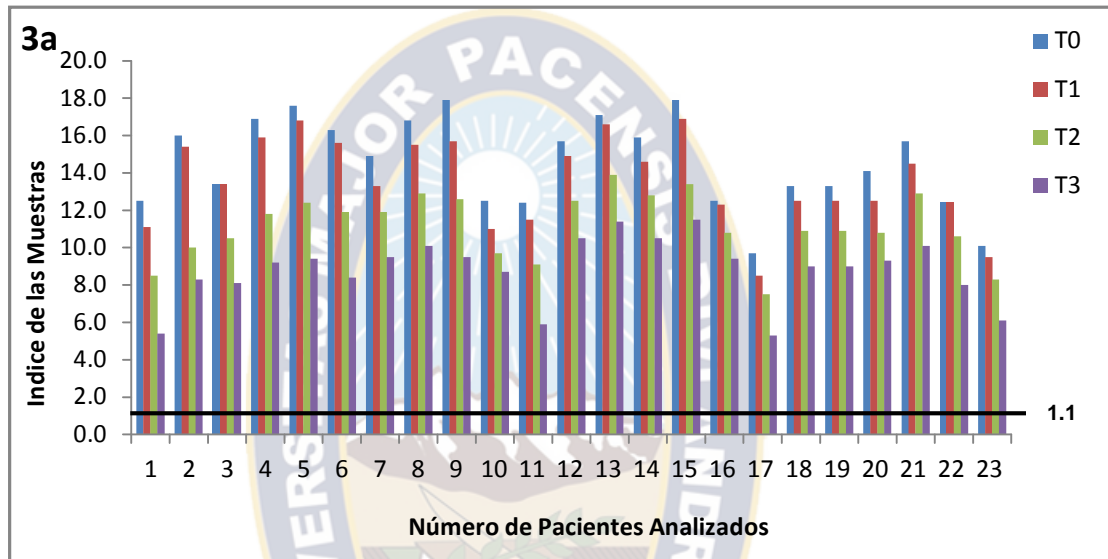
3. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con EVANTA.

En la Gráfica N° 3 a, b y c se observan los resultados de anticuerpos de tipo IgE (ELISA) en 23 pacientes tratados con EVANTA, se incluye el promedio y el porcentaje de índice de las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

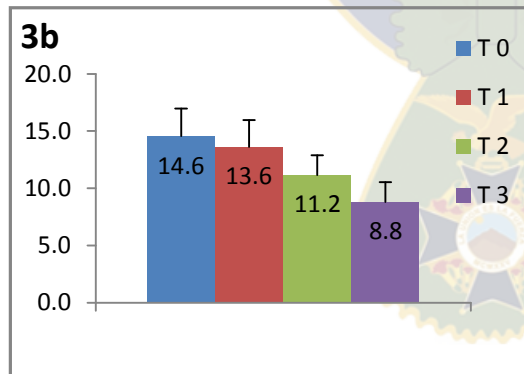
En la gráfica 3a, se observa que de los 23 pacientes evaluados, 2 pacientes (Números: 3 y 22) no consiguieron disminuir los niveles de anticuerpos a los 30 días de iniciado el tratamiento, el resto, 21 pacientes (91%) consiguieron una

disminución leve de los niveles de anticuerpos a los 30 días de iniciado el tratamiento. También, se observa que 4 pacientes (Números: 1, 11, 17 y 23) fueron los que consiguieron una mayor disminución de los niveles de anticuerpos a los 90 días de iniciado el tratamiento, siendo en rango de disminución de los niveles de anticuerpos del 11,2% al 5,7% con respecto al valor inicial en este grupo de pacientes. Por otra parte se observó que ninguno de los pacientes que recibieron tratamiento con Evanta después de los 90 días de iniciado el tratamiento no consiguió negativizar los niveles de anticuerpos (índice menor o igual 0,90). Se observó también en los pacientes evaluados, que el promedio del índice de las muestras a los 30 días de haber terminado el tratamiento era de 8,8. La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgE medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=17,88$ con un valor crítico de 1,72 (IC = -1,72 a 1,72: $p<0,05$) (ver gráfica 3b). Y que los pacientes producto del tratamiento con Evanta consiguieron disminuir sus niveles de anticuerpos en un 40% (ver gráfica 3c) con respecto a los niveles iniciales antes de recibir tratamiento. Se resalta que con este tratamiento hubieron 4 pacientes (Números: 8, 12, 13 y 14) que hicieron recidivas, es decir, en estos pacientes fracasó el tratamiento con Evanta, En este grupo en particular el rango del porcentaje de disminución de los niveles de anticuerpos varió del 16,4% al 10,6%.

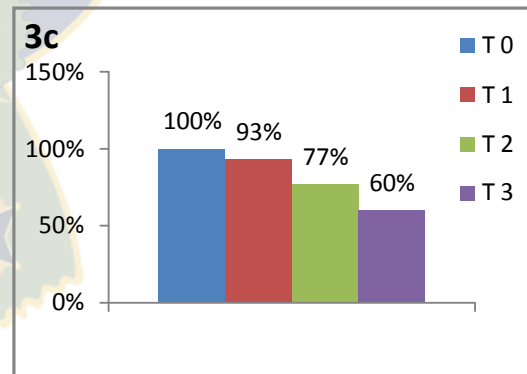
GRÁFICA Nº 3 a) Niveles de anticuerpos IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con Evanta en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 30 días de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 60 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 90 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación del promedio de los niveles de anticuerpos IgE en diferentes tiempos de evaluación en los pacientes en estudio. (t=17,88) (p<0,05)



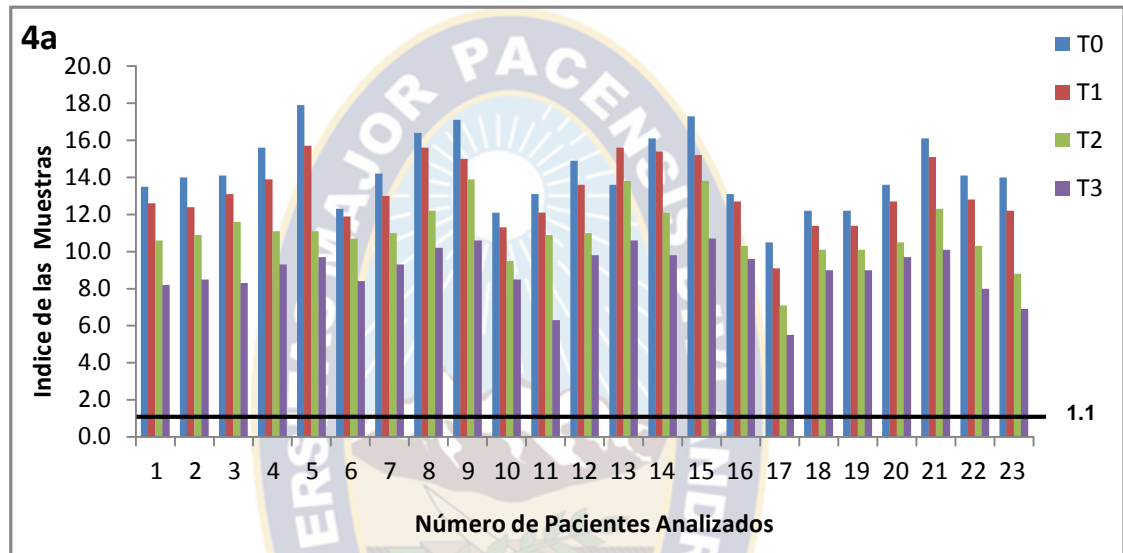
Variación de los porcentajes de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.

4. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con EVANTA.

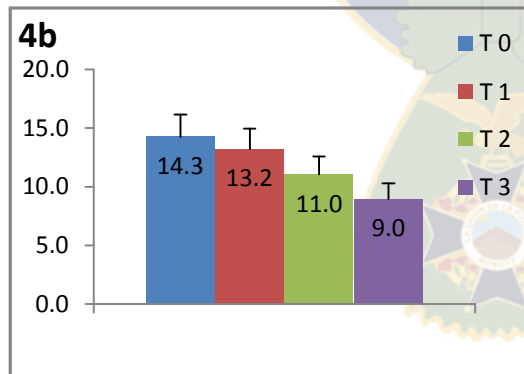
En la Gráfica N° 4 a, b y c se observan los resultados de anticuerpos de tipo IgG (ELISA) en 23 pacientes tratados con EVANTA, se incluye el promedio y el porcentaje de índice de las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

En la gráfica 4a, se observa que de los 23 pacientes evaluados, 2 pacientes (Números: 6 y 16) consiguieron una disminución muy leve del 12,7% al 9,0% con respecto al resto de los pacientes de los niveles de anticuerpos a los 30 días de iniciado el tratamiento; 1 paciente (Número: 13) experimentó una elevación en los niveles de anticuerpos a los 30 días de iniciado el tratamiento respecto a la primera muestra que se le tomó antes de recibir tratamiento. Se observa también, que ninguno de los pacientes evaluados a los 90 días de iniciado el tratamiento consiguió negativizar los niveles de anticuerpos IgG (índice menor o igual 0,90). En este grupo de pacientes se observa que el promedio del índice de las muestras a los 30 días de terminado el tratamiento era de 9,0 (índice mayor o igual a 1,10 se considera positivo). La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgG medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=17,65$ con un valor crítico de 1,72 (IC = -1,72 a 1,72: $p<0,05$) ver gráfica 4b. Los resultados muestran por otra parte que, los pacientes estudiados gracias al tratamiento con Evanta consiguieron disminuir sus niveles de anticuerpos en un 37% (ver gráfica 4c) con respecto a los niveles iniciales antes de recibir tratamiento. De los 23 pacientes estudiados, 4 pacientes (Números: 8, 12, 13 y 14) hicieron recidiva, el porcentaje de disminución de los niveles de anticuerpos IgG en estos pacientes osciló entre el 15,2% al 10,1%.

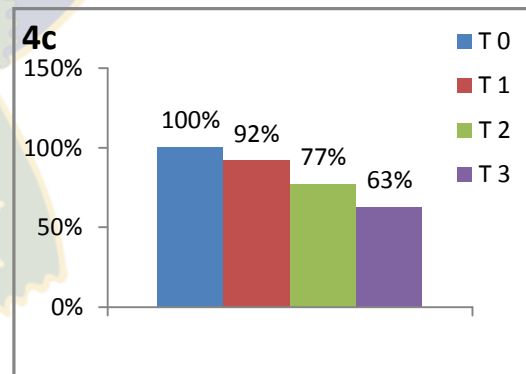
GRÁFICA N° 4 a) Niveles de anticuerpos IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con Evanta en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 30 días de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 60 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 90 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación del promedio de los niveles de anticuerpos IgG en diferentes tiempos de evaluación en los pacientes en estudio.
($t=17,65$) ($p<0,05$)



Variación de los porcentajes de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.

5. Comportamiento de los títulos de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con EVANTA.

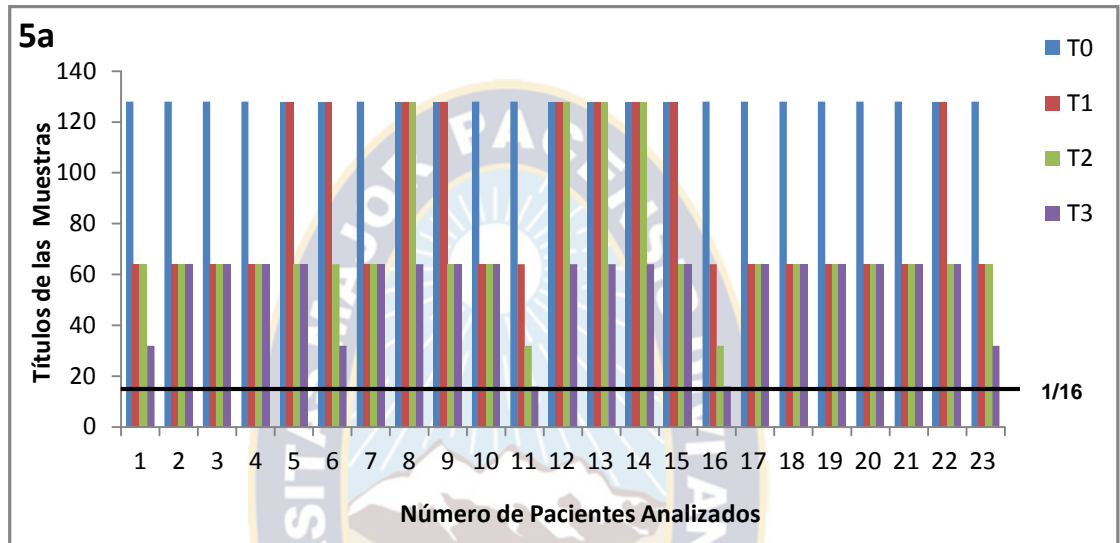
En la Gráfica N° 5 a y b se observan los resultados de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en 23 pacientes tratados con EVANTA, se incluye la disminución del título de anticuerpos de las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

En la gráfica 5a, se observa que de los 23 pacientes evaluados: 4 pacientes (Números: 8, 12, 13 y 14) no disminuyeron los títulos de anticuerpos hasta los 60 días de administrado el tratamiento y que 5 pacientes (Números: 5, 6, 9, 15 y 22) a los 30 días de tratamiento no habían disminuido el título de anticuerpos.

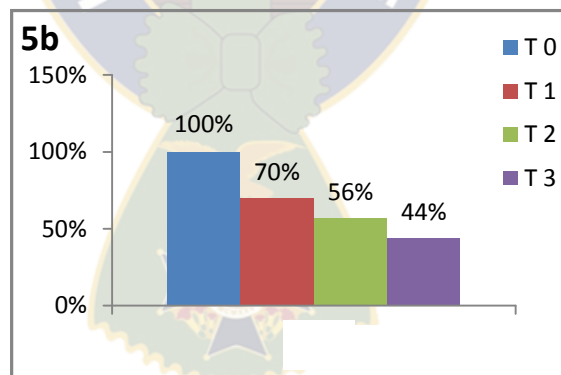
Además, se observa que 10 pacientes (Números: 2, 3, 4, 7, 10, 17, 18, 19, 20 y 21) a los 30 días de tratamiento habían conseguido disminuir los títulos de anticuerpos de 1/128 a 1/64 y no consiguieron disminuir estos niveles incluso 1 mes después de finalizado el tratamiento.

Se observa que por Inmunofluorescencia Indirecta solo 2 pacientes (Números: 11 y 16) consiguieron disminuir de manera gradual sus niveles de anticuerpos desde 1/128 hasta 1/16 (considerado negativo). En la gráfica 5b, se observa que los pacientes estudiados gracias al tratamiento con Evanta consiguieron disminuir sus títulos de anticuerpos en un 56% con respecto a los niveles iniciales antes de recibir tratamiento. La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=20,88$ con un valor crítico de 1,72 (IC = -1,72 a 1,72: $p<0,05$). En la gráfica 5a se puede observar los títulos de anticuerpos por IFI de los 4 pacientes (Números: 8, 12, 13 y 14) que hicieron recidiva al tratamiento con Evanta.

GRÁFICA N° 5 Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con EVANTA, incluyendo la disminución del título de anticuerpos en las muestras.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 30 días de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 60 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 90 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.



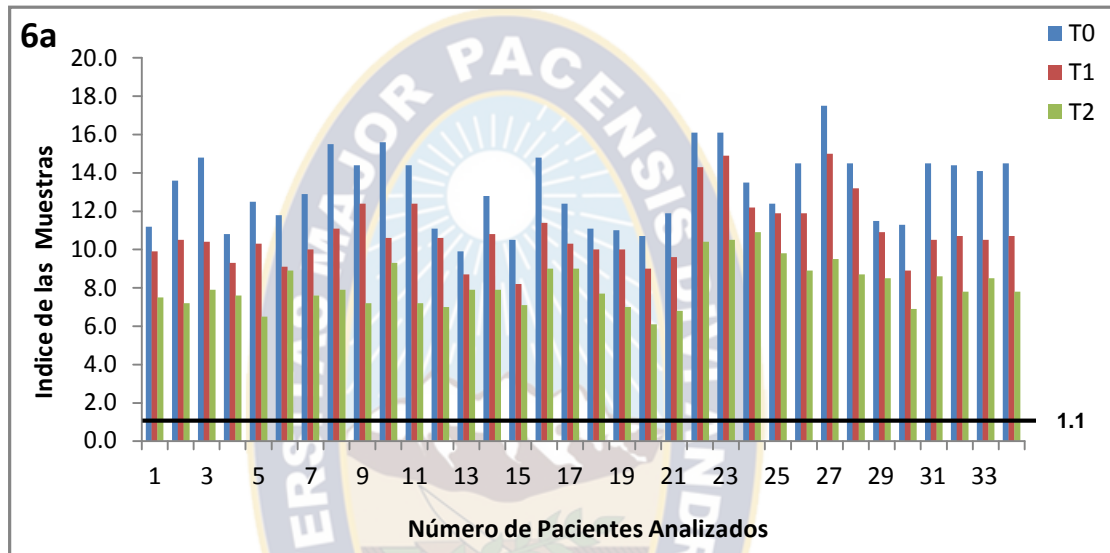
Variación de los porcentajes de anticuerpos totales presentes en diferentes tiempos de evaluación. ($t=20,88$ ($p<0,05$))

6. Comportamiento de los niveles de anticuerpos de tipo IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con GLUCANTIME (20 días).

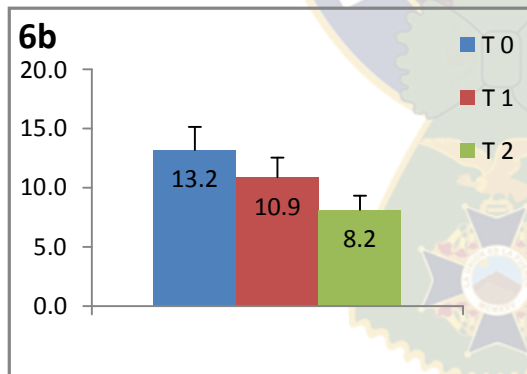
En la Gráfica N° 6 a, b y c se observan los resultados de anticuerpos de tipo IgE (ELISA) en 34 pacientes tratados con GLUCANTIME, se incluye el promedio y el porcentaje de índice de las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

Entre los resultados más sobresalientes en la gráfica 6a, se destaca que de los 34 pacientes evaluados, 3 pacientes (Números: 12, 25 y 29) consiguieron una disminución muy leve de los niveles de anticuerpos a los 20 días de iniciado el tratamiento, siendo en rango de disminución de los índices de anticuerpos del 11,7% al 8,4%. También, se observa que 1 paciente (Número: 20) fue quien consiguió una disminución mayor de los índices de anticuerpos a los 40 días de iniciado el tratamiento; en general se observa que ninguno de los pacientes evaluados a los 40 días de iniciado el tratamiento consiguió negativizar los niveles de anticuerpos. En la gráfica 6b se observa que el promedio del índice de las muestras a los 20 días después de haber terminado el tratamiento era de 8,2 (índice mayor o igual a 1,10 se considera positivos). La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgE medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=18,14$ con un valor crítico de 1,69 (IC = -1,69 a 1,69: $p<0,05$). Y que los pacientes estudiados gracias al tratamiento con Glucantime consiguieron disminuir sus niveles de anticuerpos en un 38% (ver gráfica 6c) con respecto a los niveles iniciales antes de recibir tratamiento. Cabe recalcar que con este tratamiento hubo 2 pacientes (Números: 22 y 26) que experimentaron fracaso terapéutico.

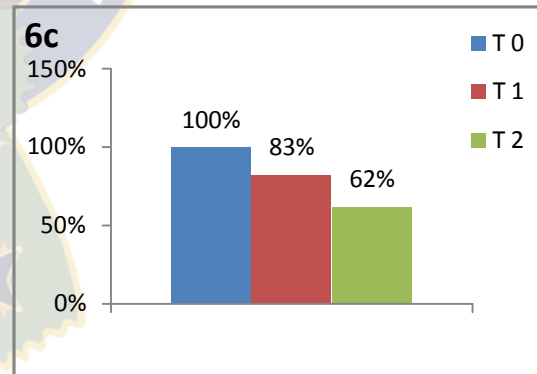
GRÁFICA N° 6 a) Niveles de anticuerpos IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con Glucantime en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 20 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T2) Ultima muestra a los 40 días, es decir 20 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación del promedio de los niveles de anticuerpos IgE en diferentes tiempos de evaluación en los pacientes en estudio. (t=18,14) (p<0,05).



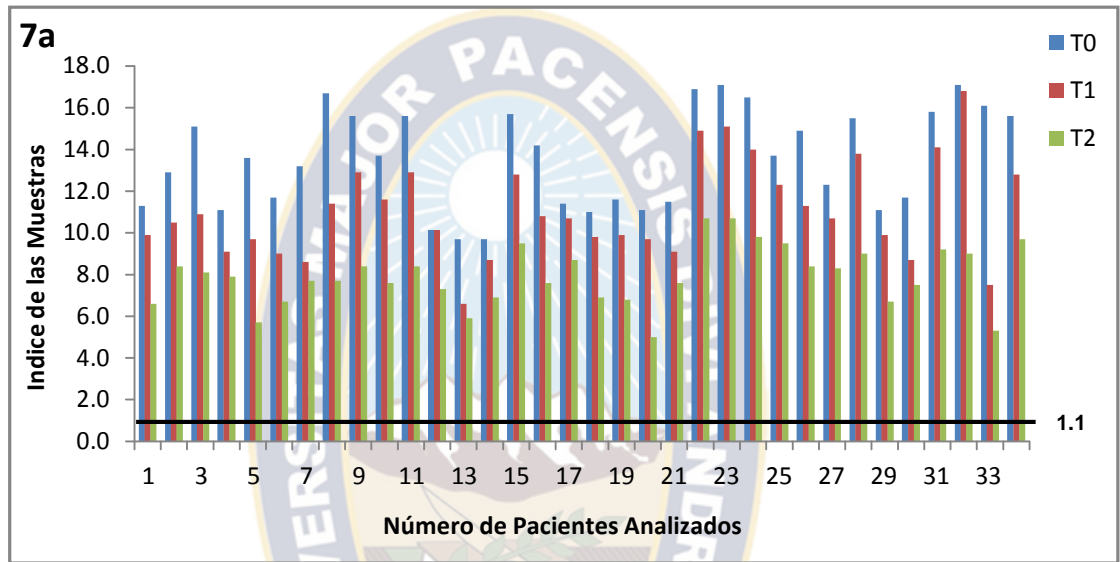
Variación de los porcentajes de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.

7. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con GLUCANTIME (20 días).

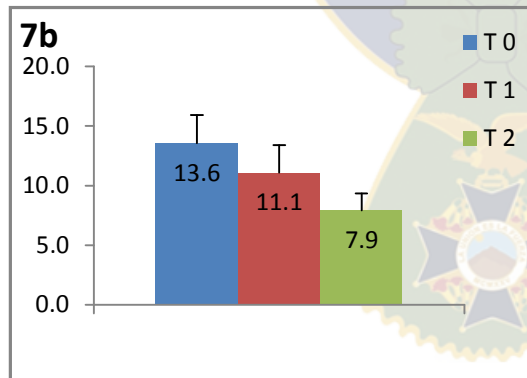
En la Gráfica N° 7 a, b y c se observan los resultados de anticuerpos de tipo IgG (ELISA) en 34 pacientes tratados con GLUCANTIME, se incluye el promedio y el porcentaje de índice de las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

En la gráfica 7a, se observa que de los 34 pacientes evaluados: 1 paciente (Número 12) no consiguió disminuir los niveles de anticuerpos a los 20 días de iniciado el tratamiento y se observa que 2 pacientes (Números: 17 y 32) consiguieron una disminución leve de los niveles de anticuerpos a los 20 días de iniciado el tratamiento siendo en rango de disminución de los niveles de anticuerpos del 14,2% al 8,8%. También, se observa que 4 pacientes (Números: 5, 13, 20 y 33) fueron los que consiguieron una disminución mayor de los niveles de anticuerpos a los 40 días de iniciado el tratamiento, siendo en rango de disminución de los niveles de anticuerpos del 12,6% al 5,5% y que ninguno de los pacientes evaluados a los 40 días de iniciado el tratamiento consiguió negativizar los niveles de anticuerpos (índice menor o igual 0,90). Se observa que el promedio del índice de las muestras a los 20 días después de haber terminado el tratamiento era de 7,9 (ver gráfica 7b). La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgG medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=17,75$ con un valor crítico de 1,69 (IC = -1,69 a 1,69: $p<0,05$). Y se observa que los pacientes estudiados gracias al tratamiento con Glucantime consiguieron disminuir sus niveles de anticuerpos en un 42% (ver gráfica 7c), con respecto a los niveles iniciales antes de recibir tratamiento.

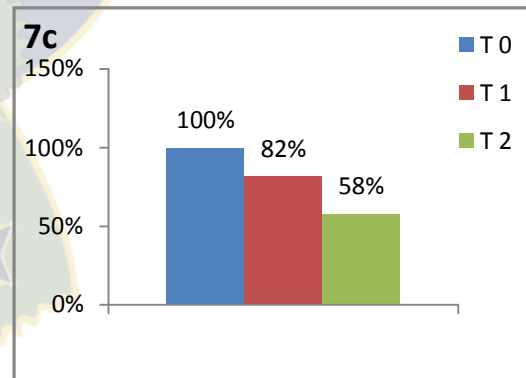
GRÁFICA N° 7 a) Niveles de anticuerpos IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con Glucantime en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 20 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T2) Ultima muestra a los 40 días, es decir 20 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación del promedio de los niveles de anticuerpos IgG en diferentes tiempos de evaluación en los pacientes en estudio. (t=17,75) (p<0,05).



Variación de los porcentajes de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.

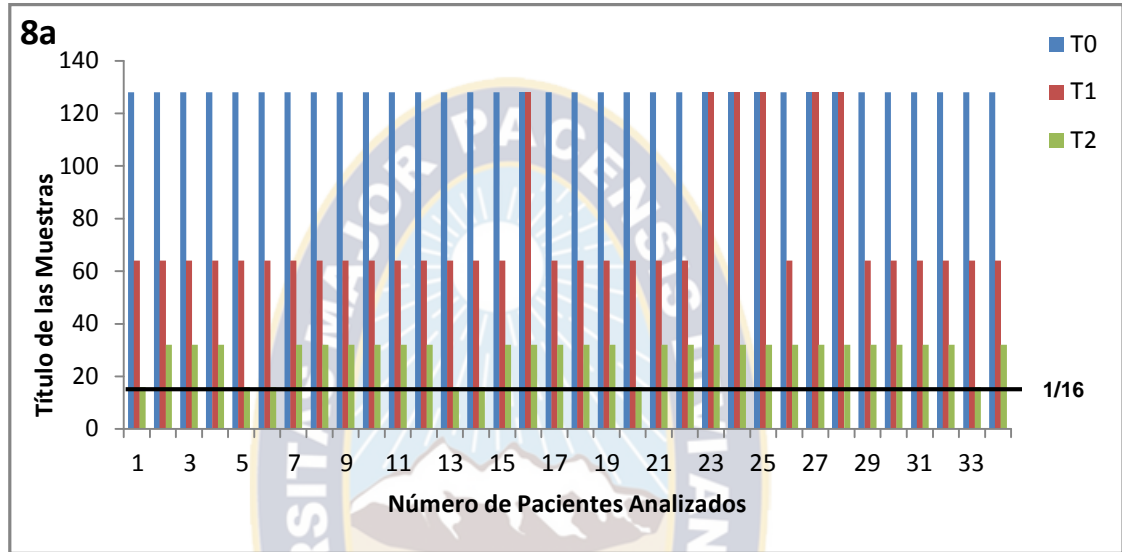
8. Comportamiento de los títulos de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con GLUCANTIME (20 días).

En la Gráfica N° 8 a y b se observan los resultados de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en 34 pacientes tratados con GLUCANTIME, se incluye la disminución del título de anticuerpos en las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

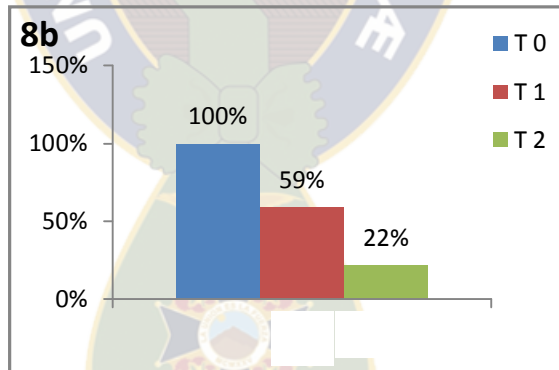
En la gráfica 8a, se observa que de los 34 pacientes analizados: 6 pacientes (Números: 16, 23, 24, 25, 27 y 28) no disminuyeron los títulos de anticuerpos hasta los 20 días de administración del tratamiento. Además, se observa que 28 pacientes (82%) a los 20 días habían conseguido disminuir sus títulos de anticuerpos de 1/128 a 1/64.

Se observó que por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) 7 pacientes (Números: 1, 5, 6, 13, 14, 20 y 33) consiguieron disminuir de manera gradual sus niveles de anticuerpos desde 1/128 hasta 1/16 (considerado negativo). Se observa también, que los pacientes estudiados gracias al tratamiento con Glucantime consiguieron disminuir sus títulos de anticuerpos en un 78% (ver gráfica 8b) con respecto a los niveles iniciales antes de recibir tratamiento. La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=88,17$ con un valor crítico de 1,69 (IC = -1,69 a 1,69: $p<0,05$).

GRÁFICA N° 8 Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con GLUCANTIME, incluyendo porcentaje de las muestras.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 20 días de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T2) Última muestra a los 40 días, es decir 20 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación de los porcentajes de anticuerpos totales presentes en diferentes tiempos de evaluación. (t=88,17) (p<0,05).

9. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B” (4 meses).

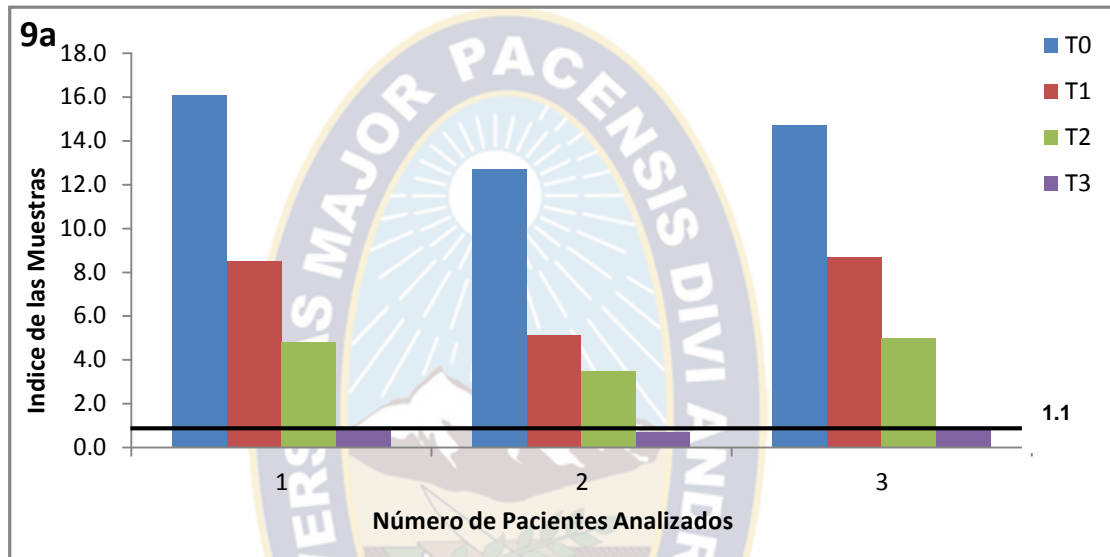
En la Gráfica N° 9 a, b y c se observa los resultados de los niveles de anticuerpos de tipo IgE (ELISA) en 3 pacientes tratados con ANFOTERICINA “B”, se incluye el promedio y el porcentaje de índice de las muestras obtenido en cada periodo de evaluación.

En la gráfica 9a, se observa que cada uno de los pacientes evaluados disminuye significativamente los niveles de anticuerpos tipo IgE desde el diagnóstico inicial hasta la culminación del tratamiento. Todos los pacientes evaluados a los 150 días de iniciado el tratamiento, es decir 30 días después de haber terminado el tratamiento, consiguieron negativizar los niveles de anticuerpos (índice menor o igual 0,90).

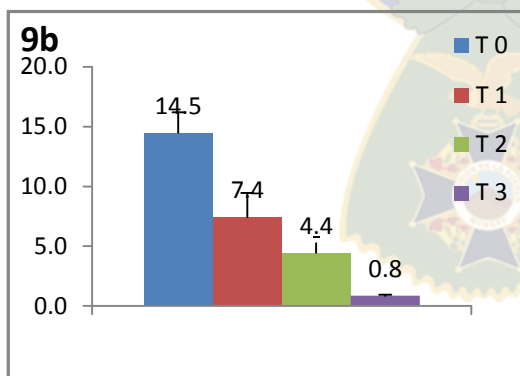
En la gráfica 9b, se observa que estos pacientes redujeron el índice del valor promedio del índice de las muestras desde 14,5 (antes de iniciar el tratamiento) hasta 0,8 (1 mes después de terminado el tratamiento). La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgE medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=14,76$ con un valor crítico de 2,92 (IC = -2,92 a 2,92) ($p<0,05$).

En la gráfica 9c, se observa que los pacientes al finalizar el tratamiento habían reducido en un 70% los niveles de anticuerpo evaluado y que 1 mes después de haber culminado el tratamiento habían reducido en un 94% los niveles de anticuerpo.

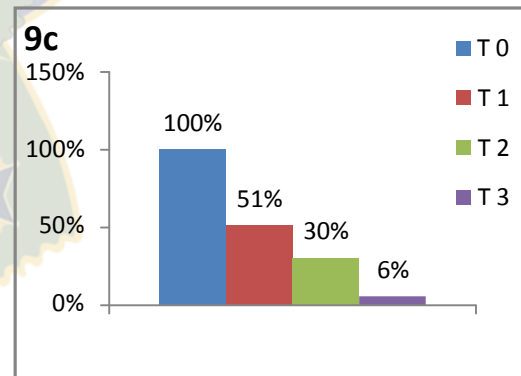
GRÁFICA Nº 9 a) Niveles de anticuerpos IgE medidos por ELISA en pacientes tratados con Anfotericina “B” en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 2 meses (60 días) de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 4 meses (120 días) de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 150 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación del promedio de los niveles de anticuerpos IgE en diferentes tiempos de evaluación en los pacientes en estudio. (t=14,76) (p<0,05).



Variación de los porcentajes de anticuerpos IgE presentes en diferentes tiempos de evaluación.

10. Comportamiento de los niveles de anticuerpo de tipo IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B” (4 meses).

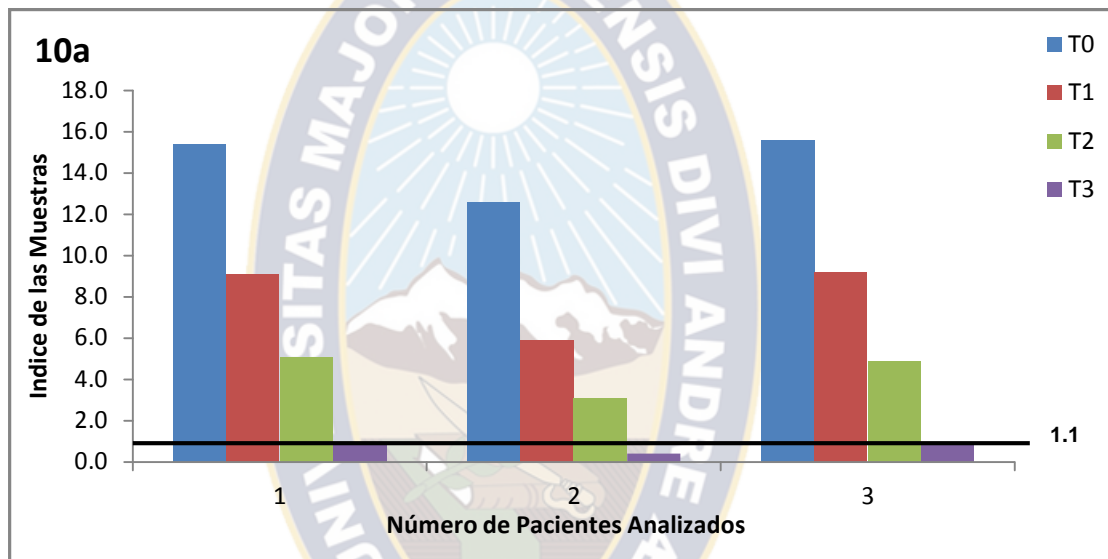
En la Gráfica N° 10 a, b y c se observan los resultados de anticuerpos de tipo IgG (ELISA) en 3 pacientes tratados con ANFOTERICINA “B”, se incluye el promedio y el porcentaje de índice de las muestras obtenidas en cada periodo de evaluación.

En la gráfica 10a, se observa que todos los pacientes evaluados disminuyeron sistemáticamente sus niveles de anticuerpos en cada periodo de evaluación.

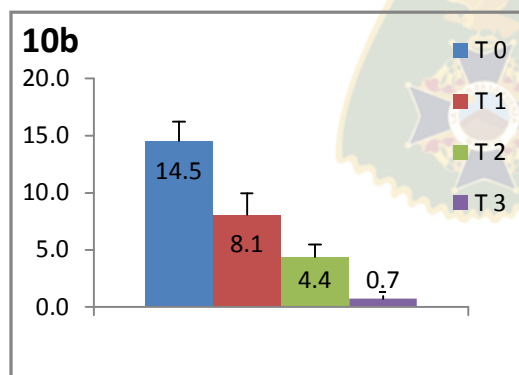
En la gráfica 10c se observa una reducción en un 70% de los niveles de anticuerpos al culminar el tratamiento y en un 95% de disminución de los niveles de anticuerpos 2 meses después de haber terminado el tratamiento.

Siendo el promedio del índice de las muestras en la última determinación de 0,7 (ver gráfica 10b). La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgG medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=16,93$ con un valor crítico de 2,92 (IC = -2,92 a 2,92: $p<0,05$).

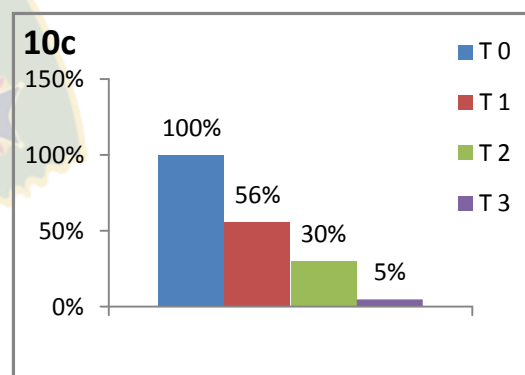
GRÁFICA Nº 10 a) Niveles de anticuerpos IgG medidos por ELISA en pacientes tratados con Anfotericina “B” en diferentes tiempos de evaluación. b) Índice promedio de los niveles de anticuerpos de los pacientes en estudio y c) Porcentaje de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 2 meses (60 días) de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 4 meses (120 días) de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Ultima muestra a los 150 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.



Variación del promedio de los niveles de anticuerpos IgG en diferentes tiempos de evaluación en los pacientes en estudio. (t=16,93) (p<0,05).



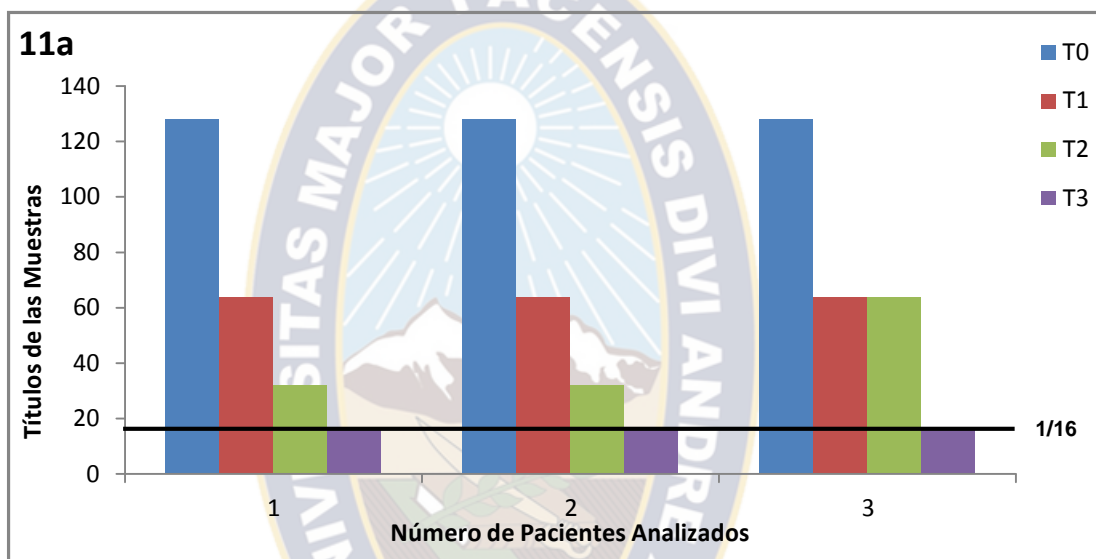
Variación de los porcentajes de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación.

11. Comportamiento de los títulos de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B” (4 meses).

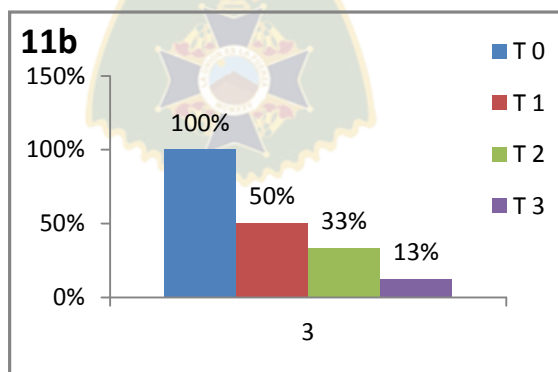
En la Gráfica N° 11 a y b se observan los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* por Inmunofluorescencia Indirecta de los 3 pacientes tratados con Anfotericina “B”, se incluye la disminución del título de anticuerpos en las muestras obtenido en cada periodo de evaluación. En la gráfica 11a, se observa que los 3 pacientes, un mes después del tratamiento alcanzaron negativizar el título de anticuerpos anti-*Leishmania*.

En la gráfica 11b, se observa que los pacientes al mes de concluido el tratamiento lograron disminuir en promedio un 87% de los niveles de anticuerpos. La comparación de las medias de los niveles de anticuerpos IgG medidos antes del tratamiento y después de un mes de concluido el tratamiento no muestra diferencia significativa, siendo el valor de $t=15,84$ con un valor crítico de 2,92 (IC = -2,92 a 2,92: $p<0,05$).

GRÁFICA N° 11 Resultados de Inmunofluorescencia Indirecta medidos por IFI en pacientes con tratamiento de ANFOTERICINA “B”, se incluye la disminución del título de anticuerpos en las muestras.



- (T0) Primera muestra como diagnóstico (antes del tratamiento)
- (T1) Segunda muestra a los 2 meses (60 días) de iniciado el tratamiento
- (T2) Tercera muestra a los 4 meses (120 días) de iniciado el tratamiento (representa el final del tratamiento)
- (T3) Última muestra a los 150 días, es decir 30 días después de haber concluido con el tratamiento.



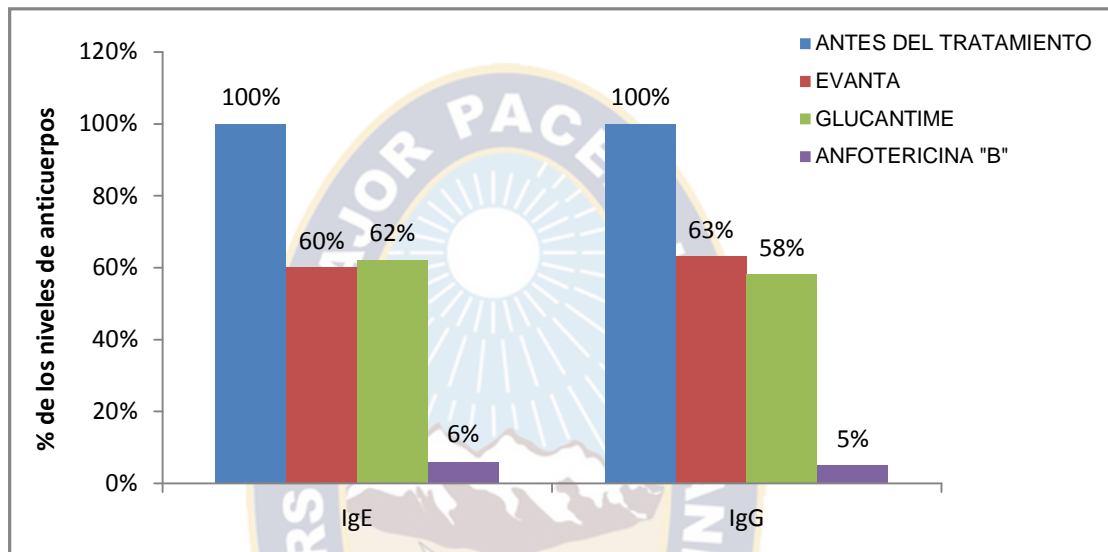
Variación de los porcentajes de anticuerpos IgG presentes en diferentes tiempos de evaluación. (t=15,84) (p<0,05).

12. Determinación del grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG con el éxito al tratamiento leishmanicida.

En la grafica N° 12 se comparan los porcentajes de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG alcanzados al mes de culminado el tratamiento (con respecto a los niveles de anticuerpos antes de iniciar el tratamiento) en los tres grupos de tratamiento estudiados, se observa que la Evanta consiguió una disminución del 40% y 37% para anticuerpos IgE e IgG respectivamente. El Glucantime mostró una capacidad de disminuir de 38% y 42% para anticuerpos IgE e IgG respectivamente y la Anfotericina “B” tanto para anticuerpos IgE e IgG consiguió disminuir en un 94% y 95% de los niveles iniciales de anticuerpos.

Por otra parte, para comparar la existencia de diferencias significativa de los niveles de promedios de anticuerpos IgE e IgG entre los tratamientos de Evanta y Anfotericina B con respecto al tratamiento de uso convencional “Glucantime” mediante el test de Student, se demostró que el tratamiento con Evanta no disminuye significativamente los niveles de anticuerpos IgE al mes de culminado de tratamiento siendo el valor de $t=1,59$ con un valor critico de 1,69 (IC = -1,69 a 1,69: $p<0,05$). En el caso de los anticuerpos IgG se observa que el tratamiento con Evanta disminuye de manera significativa los títulos de anticuerpos, siendo el valor de $t=2,79$ con un valor critico de 1,68 (IC = -1,68 a 1,68: $p<0,05$). El tratamiento con Anfotericina B mostro tanto para los anticuerpos IgE e IgG ser capaz de disminuir significativamente los niveles de anticuerpos respecto al tratamiento de Evanta, para anticuerpos IgE el valor de t alcanzado fue de 34,38, con un valor critico de 1,69 (IC = -1,69 a 1,69: $p<0,05$); para anticuerpos IgG un valor de t de 25,15 con un valor critico de 1,73 (IC = -1,73 a 1,73: $p<0,05$).

GRÁFICA N° 12 Determinación del grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG con el éxito al tratamiento leishmanicida.



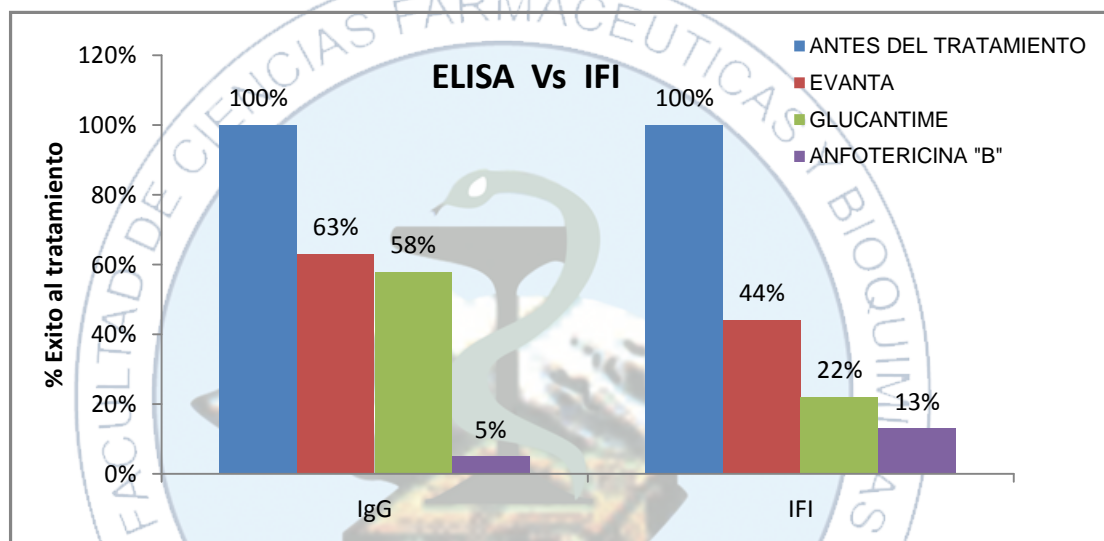
■ Antes del tratamiento, es decir cuando se diagnosticó la enfermedad
■ Pacientes tratados con Evanta durante 60 días
■ Pacientes tratados con Glucantime durante 20 días
■ Pacientes tratados con Anfotericina "B" durante 120 días

13. Correlación de los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con los resultados de las pruebas de ELISA.

En la gráfica N° 13 se comparan los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con los resultados de la prueba de ELISA (para determinar anticuerpos IgG anti-*Leishmania*). En esta gráfica se observa que en el caso de los tratamientos con Evanta y con Glucantime los niveles de anticuerpos IgG medidos por IFI fueron más bajos que los niveles de anticuerpos medidos por ELISA. En el caso del tratamiento con Evanta se obtuvo una disminución del 56% por IFI frente al 37% alcanzado por ELISA. En el tratamiento con Glucantime por IFI se evidenció una disminución del 78% respecto al 42%

alcanzado por ELISA. En el tratamiento con Anfotericina "B" la disminución de los niveles de anticuerpos IgG por ELISA fue del 95% frente al 87% alcanzada por IFI. Obteniendo un valor de chi-cuadrado de 3,00.

GRÁFICA Nº 13 Correlación de los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con los resultados de la prueba de ELISA (que determina anticuerpos IgG anti-*Leishmania*).



- Antes del tratamiento, es decir cuando se diagnosticó la enfermedad
- Pacientes tratados con Evanta durante 60 días
- Pacientes tratados con Glucantime durante 20 días
- Pacientes tratados con Anfotericina "B" durante 120 días

$\chi^2 = 3,00$

XI. DISCUSIÓN

1. Comportamiento de los niveles de anticuerpos determinados por IFI y ELISA en pacientes tratados con EVANTA.

En los 23 pacientes tratados con EVANTA, a los 90 días de iniciado el tratamiento se evidenció que ninguno de ellos consiguió negativizar los niveles de los anticuerpos anti-*Leishmania*, encontrándose para estos pacientes que el índice promedio a los 90 días era de 8,8 para IgE y de 9,0 para IgG. También, se observó que a los 90 días de iniciado el tratamiento con EVANTA, 19 pacientes mostraron una cicatrización evidente de la lesión (cura clínica) pero continuaban con niveles de anticuerpos anti-*Leishmania* positivos, siendo el índice promedio de anticuerpos para estos pacientes de 7,3 para IgE y de 7,4 para IgG.

La determinación de anticuerpos por Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de todos los pacientes tratados con Evanta, mostró que 4 pacientes no disminuyeron los títulos de anticuerpos hasta los 60 días de iniciado el tratamiento y que solamente 12 pacientes lograron disminuir gradualmente los títulos desde 1/128 hasta 1/16 (considerados negativos).

Por otra parte, se observó que de los 23 pacientes tratados con EVANTA, 4 pacientes (Números: 8, 12, 13 y 14) no respondieron al tratamiento, en estos pacientes el índice promedio de anticuerpos IgE e IgG a los 90 días de iniciado el tratamiento era de 1,53 y 1,56 respectivamente. Estos pacientes fueron sometidos a un nuevo esquema terapéutico con sujetos a un nuevo esquema terapéutico con Glucantime. (Datos no mostrados).

La eficacia en el tratamiento clínico con EVANTA fue de 83%. Este resultado se debe a que existieron 4 pacientes que hicieron recidiva, es decir que fracasó el

tratamiento. Al analizar los resultados se puede observar que determinar los niveles de anticuerpos IgE e IgG por ELISA y anticuerpos IgG por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) no es un herramienta útil en el seguimiento de pacientes tratados con EVANTA, puesto que a los 30 días después de haber concluido el tratamiento, en todos los pacientes tratados los niveles de anticuerpos están por encima de los niveles normales. Para confirmar esta hipótesis se debe hacer un estudio en pacientes tratados con Evanta que incluya un seguimiento a los 6 meses, 9 meses y 12 meses después de culminado el tratamiento. De esta manera se podría evaluar si los niveles de anticuerpos descienden sistemáticamente cuando los pacientes hacen cura clínica, e incluso evaluar una posible elevación de los mismos en caso de fracaso terapéutico que después de 6 meses ó más estos pacientes reactivan la enfermedad.

Corona F. Bonfante R., realizaron un estudio en la Unidad en Investigaciones Parasitológicas Medicas (Maracaibo Venezuela - 2000), en el cual concluyen que la determinación de anticuerpos (por ELISA) en individuos aparentemente normales y sin cicatrices, justifica la existencia de formas subclínicas de la infección. Asimismo, la cura espontánea de lesiones cutáneas asociadas a la ausencia de lesiones mucosas, puede significar una mayor resistencia del hospedero o una atenuación de la cepa predominante.

En los pacientes que hicieron fracaso terapéutico, hubiese sido importante hacer estudios más profundos que evalúen las características genéticas tanto de la cepa del parásito como del paciente lo cual permitirá determinar una probable asociación genética con el fracaso terapéutico.

Boelaert M., y Fagundes A., realizaron un estudio en el Departamento de Microbiología y Parasitología (México D.F. – 2010), donde proponen que para evaluar las características genéticas y la discriminación entre especies, se

requiere de una batería de métodos de identificación entre los cuales se considera el cultivo de promastigotes con anticuerpos monoclonales y perfiles isoenzimáticos, técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para el diagnóstico y distinción de género y especie.

2. Comportamiento de los niveles de anticuerpos determinados por IFI y ELISA en pacientes tratados con GLUCANTIME.

En los pacientes tratados con GLUCANTIME a los 40 días de iniciado el tratamiento, (20 días después de haber concluido el tratamiento). Mediante la prueba de ELISA se observó que ninguno de ellos consiguió negativizar los niveles de anticuerpos IgE e IgG, siendo los índices de absorvancia promedio de 8,2 y 7,9 respectivamente. Contrariamente, se observó que por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), 7 pacientes consiguieron disminuir de manera gradual los niveles de anticuerpos de 1/128 a 1/16. También, se observó que el resto de los pacientes pese a hacer cura clínica de la lesión disminuyeron sus niveles de anticuerpos desde 1/128 a 1/32. Lo cual podría considerarse desde el punto de vista del diagnóstico serológico como positivos. En general en estos pacientes podría considerarse que el hecho de disminuir desde 1/128 a 1/32 sus títulos de anticuerpos es una buena respuesta al tratamiento ya que se relaciona con la cicatrización de la lesión.

Es importante mencionar que 2 pacientes (Números: 22 y 26) que fueron tratados con Glucantime reportaron fracaso terapéutico y fueron sometidos a un nuevo esquema terapéutico con Glucantime. (Datos no mostrados).

La eficacia en el tratamiento con GLUCANTIME fue de 94%, para la determinación de anticuerpos IgE, IgG por ELISA y anticuerpos totales por IFI. Sáenz R., y Paz H., en el 2009 realizaron un estudio en Panamá, sobre la evaluación de la efectividad del Glucantime en el tratamiento de la Leishmaniasis

cutánea, y utilizaron dosis terapéuticas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para tal efecto, trataron un grupo de 59 pacientes que tenían leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis panamensis*, con Glucantime durante 20 días, en dosis diarias de 20 mg por Kg de peso, por vía intramuscular (hasta un máximo de 850 mg diariamente). Esta droga antimonial fue efectiva reportando un total de 35 pacientes (70%) que se hizo negativo parasitológicamente al finalizar el tratamiento y quienes permanecieron cicatrizados después de 12 meses de seguimiento; en 13 pacientes (26%), cicatrizó la lesión, pero se reactivó entre el primer y sexto mes después del tratamiento, a estos 13 pacientes se les administro nuevamente el tratamiento según el protocolo dando como resultado la cura parasicológica de la enfermedad (no hicieron recidiva al año de iniciado el tratamiento); en otros 2 pacientes (4%) se observó una cicatrización incompleta y la persistencia de los parásitos hasta por 2 meses. Los hallazgos de estos investigadores muestran una eficacia terapéutica del 96% valor similar al que hemos determinado en el presente estudio. Cabe mencionar que Saenz y Paz no evaluaron los niveles de anticuerpos IgG e IgE por ELISA ni por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

3. Comportamiento de los niveles de anticuerpos determinados por IFI y ELISA en pacientes tratados con ANFOTERICINA “B”

En los tres pacientes evaluados se pudo observar que a los 30 días después de haber concluido el tratamiento), se negativizaron los índices de las muestras tanto para anticuerpos IgE como para anticuerpos IgG, estos resultados también fueron corroborados por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Si bien el número de pacientes es pequeño, se recalca que estos pacientes no reportaron fracaso terapéutico, esto podría deberse al tiempo de tratamiento (4 meses). Por lo tanto, en estos pacientes el seguimiento del comportamiento de los niveles de anticuerpos fue más largo con respecto a los otros dos esquemas

de tratamiento evaluados en el presente trabajo. La eficacia encontrada para ANFOTERICINA “B” como tratamiento leishmanicida fue de 100%.

Morales J., realizó un estudio en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, Departamento de Hematología e Infectología (México D.F. – 2001), en ese estudio utilizó un esquema de tratamiento con Anfotericina “B” a dosis de 0.75–1.0 mg/kg de peso, por 15 días en días alternos, cuyo estudio mostró efectividad de cura mayor al 97% en pacientes con *Leishmania visceral* afirmando que sería una alternativa eficaz para el tratamiento de esta patología. Por su parte Del Rosal T. y Baquero F., realizaron un estudio en el Hospital Infantil Elena. Valdemoro Madrid-España en el 2010, en el que concluyeron que la Anfotericina “B” es un fármaco muy efectivo, con menor toxicidad frente al Glucantime y que requiere de periodos de hospitalizaciones más cortos, siendo el costo final del tratamiento inferior al de los antimoniales pentavalentes. Su estudio reportó que los pacientes evolucionaron de forma favorable sin presentar efectos secundarios.

Figueras N., García M. J., en Barcelona España el 2010 evaluaron a la Anfotericina “B” como tratamiento leishmanicida en 32 pacientes. El tratamiento consistía en la administración de una dosis de 4 mg/kg de peso/día; los días 1 a 5 y 10, alcanzándose una dosis total de 24 mg/kg de peso de Anfotericina “B” administrada en 6 dosis a lo largo de 10 días. Ellos concluyen que es eficaz y seguro para tratar Leishmaniasis visceral, permitiendo además reducir la estancia hospitalaria. Las dosis se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se infundió durante 30 – 60 minutos en un 5% de dextrosa por vena periférica. La serología (IFI y ELISA) fue positiva en el 100% de los casos evaluados antes del inicio del tratamiento. Contrariamente a los resultados reportados por Morales y Del Rosal, estos autores reportaron que al final del tratamiento existió una curación de 27 pacientes y 9 pacientes hicieron recidivas.

De los 9 pacientes que hicieron recidivas, a 5 pacientes les readministraron Anfotericina “B” en las dosis ya mencionadas. Luego, se hizo una nueva evaluación a los 2 meses de haber concluido con el tratamiento y se observó que todos los pacientes se habían curado de la Leishmaniasis obteniendo “cero” de fracaso terapéutico, donde los resultados de serología (IFI y ELISA) fueron negativos en todos los pacientes evaluados. En el presente estudio determinamos una eficacia terapéutica similar demostrándose que los anticuerpos alcanzaron títulos o niveles de negatividad cuando los pacientes hicieron la cura clínica, lo cual a su vez ha permitido demostrar la utilidad de los anticuerpos para demostrar la cura clínica y serológica del paciente infectado con *Leishmania*.

4. Determinación del grado de correlación de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG con el éxito o fracaso al tratamiento leishmanicida.

En el caso de la Anfotericina “B” se determinó que la evaluación serológica de los niveles de anticuerpos de tipo IgE e IgG por ELISA e IFI guarda estrecha relación con la cura clínica de la enfermedad, negativizándose los índices de absorvancia y títulos de anticuerpos por IFI y ELISA.

En el caso de los pacientes tratados con Evanta solo se consiguió una disminución del 40% y 37% para anticuerpos IgE e IgG respectivamente, y del 56% para la determinación de títulos de anticuerpos por IFI. Resultado similar se obtuvo en el caso de los pacientes tratados con Glucantime en los cuales se obtuvo una disminución del 38% (IgE) y 42% (IgG), y para IFI una disminución del 78%. Se recalca, que la mayor disminución fue obtenida con el tratamiento de Anfotericina “B”, seguido por el tratamiento con Evanta y por último el tratamiento con Glucantime. Los niveles de anticuerpos encontrados por cada tipo de tratamiento podrían deberse fundamentalmente al tiempo de administración del tratamiento y el tiempo definido para la última toma de muestra

en el estudio. A decir, los pacientes tratados con Anfotericina “B” tuvieron un tiempo de seguimiento de 4 meses. En caso de éxito este tiempo podría ser el necesario para que los niveles de anticuerpos disminuyan hasta llegar a niveles normales.

Respecto a los pacientes tratados con Evanta (tratados por 60 días), se esperaría una disminución significativa de los niveles de anticuerpos en caso de cura clínica debido a que recibieron tratamiento por tiempo prolongado. Estos pacientes solo consiguieron disminuir aproximadamente un 40% de los niveles iniciales de anticuerpos. Hecho que podría deberse a que se trata de un medicamento elaborado a partir de alcaloides totales (producto natural) que entre sus muchos componentes contienen sustancias no Leishmanicidas. Se deben realizar más estudios con medicamentos que contengan los alcaloides de la planta que tienen actividad Leishmanicida demostrada y evaluar su relación con el éxito o fracaso terapéutico mediante la clínica, métodos parasitológicos y serológicos.

En el caso de los tratamientos con Evanta y Glucantime se observó al mes de culminado el tratamiento que en pacientes que hacen cura clínica de la enfermedad los títulos de anticuerpos por IFI disminuyen desde 1/128 a 1/32.

5. Determinación del tipo de anticuerpo que se correlaciona mejor con el éxito o fracaso del tratamiento.

Por los resultados obtenidos, pudimos evidenciar que los dos tipos de anticuerpos (IgE e IgG) analizados por la técnica de ELISA disminuyen de manera similar. En pacientes tratados con Evanta se evidenció que existe una diferencia del 3% de IgE respecto a IgG, la variación de las medias mostro un valor de test Student de 0,96 con un valor crítico de 1,72 (IC = -1,72 a 1,72)

($p < 0,05$), lo cual nos indica que no existe una diferencia significativa en los niveles de anticuerpos alcanzados al mes de concluido el tratamiento con Evanta. En pacientes tratados con Glucantime existe una disminución de un 4% en los niveles de anticuerpos IgE respecto a IgG, la comparación de las medias nos mostro un valor de t de Student de 1,10 con un valor critico de 1,69 (IC = -1,69 a 1,69: $p < 0,05$), lo cual se asume como ausencia de diferencia significativa en los niveles alcanzados de anticuerpos al culminar el tratamiento con Glucantime. Finalmente en pacientes tratados con Anfotericina “B” se evidencio una diferencia del 1% entre los niveles de IgE frente a los niveles de igG siendo el valor de $t=1,51$ con un valor critico de 2,92 (IC = -2,92 a 2,92; $p < 0,05$). La comparación de medias por el test de Student nos indica que en estos tres tipos de tratamientos tanto los niveles de anticuerpos IgE e IgG disminuyen en igual proporción. Lo cual contrasta con los reportes de Anan K., Atta A. y Souza M., quienes indicaron que los anticuerpos IgE son mejores predictores que los anticuerpos de tipo IgG en el seguimiento de los pacientes.

Zambrano S., Ortiz O., en el 2002, realizaron un estudio sobre el Mecanismo de Evasión de la Respuesta Inmune en el Hospital Universitario “Dr. Miguel Oraá” Venezuela y en la UNAM, en el que publicaron un aspecto más reciente y novedoso de la utilidad de los estudios serológicos en el conocimiento de la enfermedad. Acumularon evidencias sobre la asociación entre la presencia de una respuesta Th1 o Th2 con los isotípos predominantes de las inmunoglobulinas involucradas en proceso patológico. Esta observación también ha sido corroborada en otros en varios estudios muridos y humanos.

Ulrich y col., En la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, realizaron un estudio sobre el “Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la resistencia en *Leishmania*”, en el que demostraron que las IgG4 específicas para *Leishmania* predominaban en un 95% de los sueros evaluados

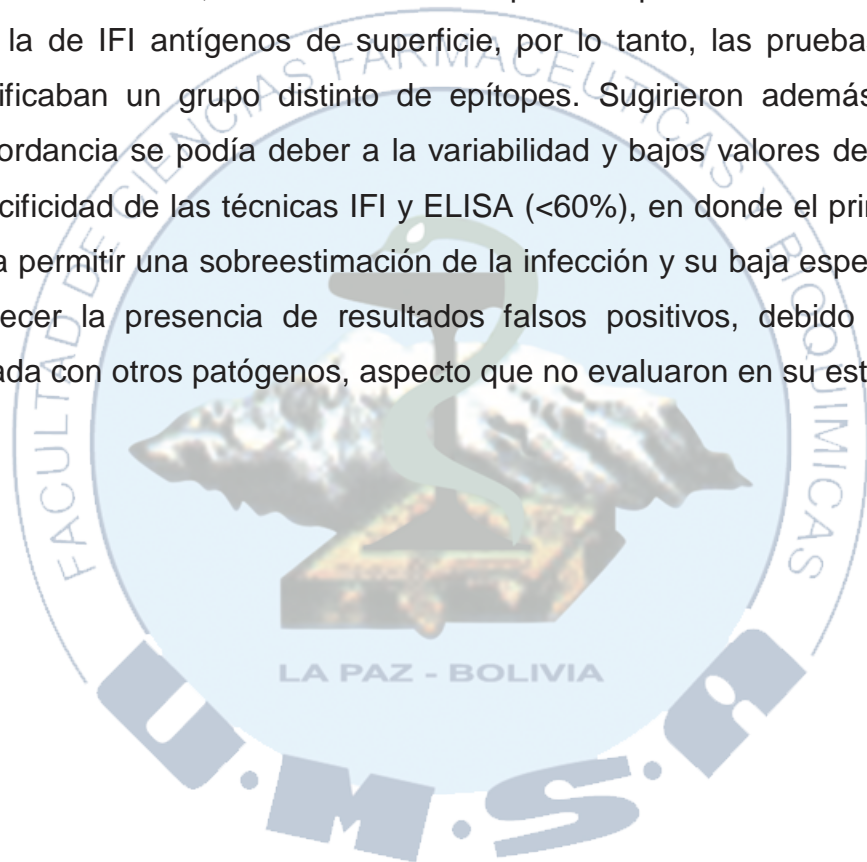
de pacientes con LCD. Estos resultados sugieren que la evaluación de las subclases de inmunoglobulinas abren una nueva perspectiva para la evaluación de la respuesta humoral en la leishmaniasis, no sólo durante el curso de la enfermedad, sino también en la evaluación de respuestas en esquemas terapéuticos y en los procesos de re-infección o reactivación de la enfermedad.

6. Correlación de los resultados de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta con los resultados de las pruebas de ELISA.

Al comparar los niveles alcanzados de anticuerpos medidos por Inmunofluorescencia Indirecta (Figuras 5a, 8a y 11a) con respecto a los resultados obtenidos por ELISA se encontró que los resultados por Inmunofluorescencia tienen mejor relación con la cura clínica (cicatrización de la lesión) del paciente. A decir: en el caso de los pacientes tratados con Evanta de los 19 pacientes que hicieron cura clínica 2 pacientes presentaron resultados negativos por IFI, siendo que por ELISA todos dieron resultados positivos. En el caso de los pacientes tratados con Glucantime de los 32 pacientes que hicieron cura clínica 7 pacientes presentaron resultados negativos por IFI, estos 7 pacientes dieron resultados positivos por ELISA. En el caso de los 3 pacientes tratados con Anfotericina “B” se observó que los niveles de anticuerpos medidos tanto por IFI como por ELISA dieron resultados negativos.

Romero M. López M., en el 2009 realizaron un estudio comparativo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la *Leishmaniasis visceral* canina, en la Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Salud Pública. El objetivo que se propusieron era de comparar la concordancia entre los resultados obtenidos por las técnicas IFI y ELISA en 72 sueros caninos procedentes de siete municipios de zonas endémicas de *leishmaniasis visceral zoonótica (LVZ)* del departamento del Tolima (Colombia). Encontraron que la concordancia entre las

diferentes técnicas comparadas fue menor del 16% (Índice kappa < 16%), lo cual sugería que las pruebas no eran consistentes y por lo tanto, no eran aceptables como método de diagnóstico en el estudio que habían conducido. Postularon que la discordancia de los resultados obtenidos por las técnicas diagnósticas ELISA e IFI se podría explicar por el hecho de haber utilizado antígenos obtenidos por métodos diferentes, teniendo en cuenta que en la primera ELISA emplearon ASL y en la de IFI antígenos de superficie, por lo tanto, las pruebas diagnósticas identificaban un grupo distinto de epítopes. Sugirieron además, que la baja concordancia se podía deber a la variabilidad y bajos valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas IFI y ELISA (<60%), en donde el primer parámetro podía permitir una sobreestimación de la infección y su baja especificidad podía favorecer la presencia de resultados falsos positivos, debido a la reacción cruzada con otros patógenos, aspecto que no evaluaron en su estudio.



XII. CONCLUSIONES

Mediante el análisis de los resultados se pudo evidenciar que los niveles de anticuerpos IgE e IgG anti - *Leishmania* no correlacionan con la cura clínica de los pacientes cuando el tiempo de tratamiento evaluado es menor a 2 meses. Y que tienen buena correlación con la cura clínica en periodos de tratamiento largos como en el caso del tratamiento con Anfotericina “B”.

De los tres tipos de tratamiento evaluados mediante el seguimiento serológico de anticuerpos se establece que el tratamiento con Anfotericina “B” por 4 meses es suficiente para conseguir la cura clínica de la enfermedad y la negativización de los anticuerpos anti-*Leishmania* se dio a los 150 días después del tratamiento.

Se determinó que los dos anticuerpos evaluados tienen similares grados de correlación con respecto a los tipos de tratamiento evaluados. Pero se determinó que los anticuerpos de tipo IgE tienden a disminuir más que los anticuerpos de tipo IgG cuando el paciente hace una cura clínica aparente.

Al relacionar los resultados de las pruebas serológicas evaluadas se determinó que la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta correlaciona mejor sus resultados con la cura clínica de los pacientes.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio nos muestran que cuando se tiene pacientes con cura clínica los niveles de anticuerpos IgE e IgG guardan correlación con los resultados después de los 6 meses de tratamiento. Por lo tanto, el seguimiento serológico de un paciente tratado con medicamentos leishmanicidas debe hacerse a partir de los 4 meses de recibido el tratamiento.

XIII. RECOMENDACIONES

Los ensayos Inmunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA) son utilizados para el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades tanto inmunes como parasitarias, que dependiendo del antígeno utilizado pueden presentar mayor sensibilidad y especificidad en comparación con otras técnicas de diagnóstico.

En nuestro caso, pudimos evidenciar que la detección de anticuerpos IgE e IgG anti-*Leishmania* en la población estudiada puede ser considerada como un método complementario para el diagnóstico de la enfermedad.

Los resultados de nuestro estudio indican que la determinación de niveles de anticuerpos IgE e IgG anti-*Leishmania* pueden usarse como marcadores sensibles y específicos para detectar la enfermedad activa. Pero si los niveles de anticuerpos van a ser utilizados como marcadores del éxito o fracaso terapéutico, se recomienda que se haga un seguimiento por más de seis meses, tiempo que permitirá evidenciar si estos niveles disminuyen en caso de cura clínica de la enfermedad.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A. K., Murfhy K. M. y Sherh 1996, Funcionalidad diversa de los Linfocitos T. 383, 387 – 793.
2. Afrin F. y Ali N. 1997. Adjuvanticity y Protective Immunity elicited by *Leishmania donovani* antigen encapsulated in positively charged liposomes. *Infect. Immun.* 25. 2371 – 2377.
3. Agerberth B, Gudmundsson GH (2006). «Host antimicrobial defence peptides in human disease». *Current Topics in Microbiology and Immunology*306: pp. 67–90.doi:10.1007/3-540-29916-5_3.PMID16909918.
4. Alexander, J. and Kaye, P.M. Immunoregulatory pathways in murine Leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin.Exp.Immunol.*, 61:674-682, 1985.
5. Alexander, J. and Phillips, R.S. *Leishmania tropica* and *Leishmania mexicana*: cross-immunity in mice. *Exp. Parasitol.*, 45: 93-100, 1978.
6. Ampuero J., Urdaneta M., De Oliveira V., *Cad. Saude Publica*, Rio de Janeiro 2005; 21: 161 – 170
7. Alvar, J. Molina, R. San Andrés, M. Tesouro, M. Nieto, J. Vitutia, M. González, F. San Andrés, MD. Boggio, J. Rodriguez, F. et al. *Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. Ann-Trop-Med-Parasitol.* 88-4: 371-379, 2004.
8. Anam K., Afrin F., Banerjee D., Pramanik N., Guha S.K., Goswami R., Saha S., Ali N. Differential Decline in *Leishmania* Membrane Antigen- Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE and IgG Subclass Antibodies in indian Kala-Azar patients after Chemotherapy Infection and Immunity. Dec. 1999; 67:12 6663 – 6669.
9. Andrade M., *Alcaloides de Rutacea: Química y actividad biológica. Tesis Doctoral* 2003, 120 – 122.

10. Antunes, C.M.F., Mayrink, W., Magalhaes, P.A., Costa, C.A., Melo, M.N. and Dias, M. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int.J.Epidemiol.* 15:572-580, 1986.
11. Arenas, R. Leishmaniasis. Atlas. Dermatología, diagnóstico y tratamiento 2005; 111: 456-459.
12. ASIS - Anuario y Atlas de Salud del Departamento de La Paz, 2009 – 2010.
13. Atta AM., Oliveira D., Atta ML., Almeida RP. Y Carvalho EM., Antileishmanial IgE antibodies: a marker of active in visceral leishmaniasis Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998;59:3 426 – 430.
14. Assis Rafael, et al. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* Sept 2012;1820(9): 1354–1365.
15. Berkow, Roberts (2008). «16» (en Español). Manual Merck.: Home edition (2da. edición). Océano. pp. 837. ISBN84-494-1184-X.
16. Berman J, Dietze R. Treatment of visceral leishmaniasis with amphotericin B colloidal dispersion. *Chemotherapy*1999 Jun 45 Suppl 1: 54-66.
17. Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, Vidaud M. Identificación de CGA como un nuevo gen del receptor de estrógeno-sensibles en el cáncer de mama:. Un marcador candidato excepcional para predecir la respuesta a la terapia endocrina . *Cancer Res.* 2001;. 61 :1652-1658.
18. Boelaert M.; Fagundes A. Aliaga L. Evaluación terapéutica de la paramomicina en casos de Leishmaniasis andina cutánea. *Publicación Dermatológica del Colegio Iberoamericano de Dermatología del Perú.* 1991; 5:13.
19. Bonifaz Pérez D., Sosa Tordoya LF., Choquehuanca Quispe JL. Instituto de Servicio de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de

San Andrés. La Paz, Bolivia. E mail: thiagobp.13@hotmail.com. Recibido para publicación: 3/08/11. Aceptado en: 20/12/11.

20. Bonfante R, Barruela S. Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002.
21. Bourdy G., Dewalt S., Chavez de Michel L., Roca A., Deharo E., Muñoz V., Quenevo C., Gimenez A. "Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. Journal of Ethnopharmacology. 2000.
22. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F. Cultura microtitulación:.... Un método sensible para la cuantificación de *Leishmania infantum* en tejidos de ratones infectados Antimicrob Agentes Chemother 2005, 39 :2167-2168.
23. Cairó Vilagran Jordy, Escuela Superior de Veterinaria de la Universidad Complutense Madrid 1996.
24. 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.
25. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. (2004). T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. J Immunol, 173: 7647-53.
26. Corona F. J.; Bonfante G. R.; Chirinos A. R.; Cárdenas E; Urdaneta I.; Urdaneta R. Prevalencia de IgG anti-leishmania en la población rural de zipayare, estado Zulia, Venezuela Otros 2008
27. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW.(2004). Autoreactive T cells in healthy individuals. J Immunol , 172: 5967-72.

28. Del Rosal T.; F Baquero. Tratamiento de la Leishmaniasis cutánea con Anfotericina B Liposomal. Publicado en An Pediatr (Barc). 2010;73:101-2. - vol.73 núm 02 .
29. Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4
30. Erb KJ (2007). «Helmintos, desórdenes alérgicos y respuesta inmune IgE mediata: Eur J Immunol37 (5): pp. 1170-1173. PMID17447233.
31. Fernández E., Rangel-Escareño C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sánchez K, Salaiza-Suazo N, et al. Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1B. PLoS Negl Trop Dis, 2012;6(5): e1533.
32. Fernández J., Matesanz J., Rodríguez R., Ballesteros S., Utilidad de la gammagrafía con ácido dimercaptosuccínico (DMSA). Servicio de Pediatría. Hospital de Cabueñes. BOL PEDIATR 20077; 37: 251-253
33. Figueras M.C.; Garcia de Miguel; F. Asensi Botet; R. Velasco Bernardo. Tratamiento de corta duracion de la Leishmaniasis visceral con Anfotericina "B" liposomica en pacientes inmunocompetentes. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Infantil Vall D'Hebron. Barcelona. Servicio de Pediatría. Madrid España.
34. Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M., 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. VetParasitol., 99(2):105-11.
35. Fitzsimmons C, McBeath R, Joseph S, Jones F, Walter K, Hoffmann K, Kariuki H, Mwatha J, Kimani G, Kabatereine N, Vennervald B, Ouma J, Dunne D (2007). «Factores que afectan las respuestas humanas a IgE y a IgG a antígenos alérgicos como *Schistosoma mansoni*: estructura molecular y patrones de exposición in vivo». Int. Arch. Allergy Immunol.142 (1): pp. 40-50. PMID17019080.

36. Flisser A, Pérez-Tamayo R. Leishmaniasis. Aprendizaje de la parasitología basada en problemas. 2006; 41: 394-409.
37. Forunet A., Gantier J., Hocquemiller R., Roblot F., Richomme P., Bruneton J., Nat. Prot. 2000. 1947 – 1952.
38. Galaktionov VG. (2004). Evolutionary development of the immunoglobulins super family. Izv Akad Nauk Ser Biol,, (2): 133-45.
39. Gallego M., Riera C. Las Leishmaniosis Humanas: Leishmaniosis Autoctona por *Leishmania Infantum*. Unidad de Parasitología, Departamento de Microbiología y Paracitología Sanitaria. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 2008.
40. Gergely J. Structural studies of immunoglobulins. Immunochemistry 1967;4:101-4.
41. Gleisch GJ. Y Adolphson, 1986. Los Leucocitos Eosinofilicos: estructura y función. Adv Inmunol 39: 177 – 253.
42. Goldsmith R, Heyneman D, y col. Parasitología y Medicina Tropical. Ed. Manual Moderno 1995, pag. 361-93.
43. Goncalves R., Vieira E., Melo M., Gollob K., Mosser D., Facultad de Medicina - DAPML - Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Departamento de Bioquímica e Imunologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. 2005.
44. Gould H et al.. «La biología del IgE y la base de la enfermedad alérgica». Annu Rev Immunol 21: pp. 579-628. PMID12500981.
45. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. Vet Parasitol, 8 Sept 2011;181(1): 23-30.
46. Grey HH, Kunkel HG. H - chain subgroup of myeloma proteins and normal 7S globulin. J Exp Med 1964;120:253-66.
47. Henao H. H., Osorio Y., Saravia N.G., Gomez A., Travi B., Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) en

- un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometria, *Biomedica* 2004; 24: 393 – 402.
48. Holtmeier W, Kabelitz D (2005). «gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses». *Chemical Immunology and Allergy* 86: pp. 151–83. doi:10.1159/000086659. PMID15976493.
 49. Ibañez S.L., Ruiz G., De Michel R., Sauvain M., Evaluacion de la flora en el valle de Zongo contra *Leishmania* y Chagas. *Rev. Bol. De Quimica* 2008; 25:1
 50. Jefferis R. Policlonal and monoclonal reagents specific for IgG subclasses. *Monograf Allergy* 1986;19:71-5.
 51. Kuroki A, Shibata T, Houda H, Totsuka D, Kobayashi K, Sugisaka T. Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse proliferative lupus nephritis, membranous lupus nephritis and idiopathic membranous nephropathy. *Intern Med* 2002;41(11):936-42.
 52. Laguna F, Lopez-Velez R, Pulido F, Salas A, Torre-Cisneros J, Torres E, Medrano FJ, Sanz J, Pico G, Gomez-Rodrigo J, Pasquau J, Alvar J. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-Leishmania Study Group. *AIDS* 1999 Jun 18 13:9 1063-9
 53. *Leishmania Group, Indian Institute of Chemical Biology,1 and Department of Tropical Medicine, School of Tropical Medicine,2 Calcutta 700032, India* .Received 22 July 1999/Accepted 31 August 1999.
 54. Matzinger P (April 2002). «The danger model: a renewed sense of self». *Science* 296 (5566): pp. 301–5. doi:10.1126/science.1071059. PMID11951032.
 55. Michael W. Pfaff, Ales Tichopad, Christian Prgomet and Tanja P. Neuvians (2005). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations *Biotechnonology Letters* **26**:509-515

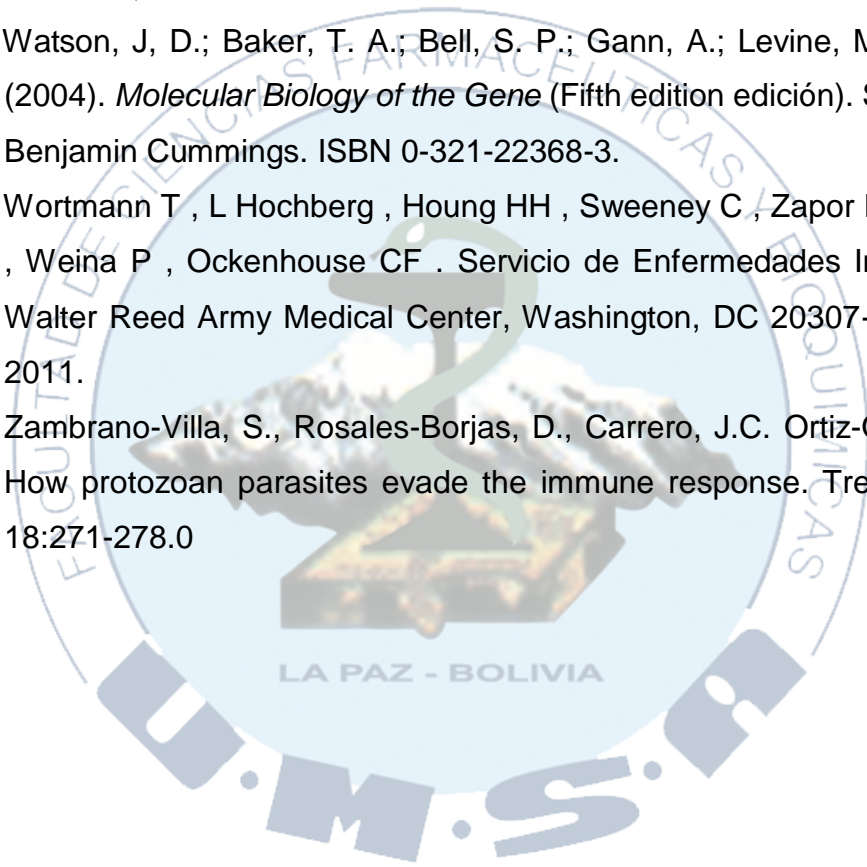
56. Middleton D, Curran M, Maxwell L (August 2002). «Natural killer cells and their receptors». *Transplant Immunology* 10 (2-3): pp. 147–64. doi:10.1016/S0966-3274(02)00062-X. PMID12216946.
57. Ministerio de Salud y Deportes. Leishmaniasis, Guía operativa para el control en Bolivia. Unidad de Epidemiología, Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis Comité de Identidad Institucional. 2007).
58. Ministerio de Salud: Perú; doctrina, normas y procedimientos para el control de la leishmaniasis en el Perú "Fronteras saludables" Convenio Binacional Perú-Ecuador 1997.
59. Mollinedo S., Torrez M., Holguin E., Vargas F., Leishmaniasis en Bolivia: Epidemiología de fin de siglo, *Rev. Medica*. Octubre – Diciembre 2000; 7:1
60. Mollinedo S., Torrez M., Holguin E., Vargas F., Leishmaniasis en Bolivia: Epidemiología de fin de siglo, *Rev. Medica*. Octubre – Diciembre 2000; 7:1
61. Momen H, Cupolillo E (2000). «Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*». *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (4): pp. 583-8. PMID10904419.
62. Montoya Y., Padilla C., Nolasco O., Leon C., Talledo M., Choque J., Caceres O., Barreto T., De los Santos M., Campos I., Douglas S., Yabar C. y Barker D. Diagnostico Molecular para las Leishmaniasis , *Rev. Medica. Exp.* 1997, 14:1.
63. *Morales J.J. Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Calle Dr. Márquez Núm. 162, Col. Doctores, Deleg. Cuauhtemoc, CP. 06720. México, D. F., México.* Fecha de recepción: 28–07–2011
Fecha de aprobación: 22–03–2012.
64. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG, (2005). «Advances in leishmaniasis». *Lancet* **366**: pp. 1561 - 77. PMID 16257344.

65. Noyes HA, Moro DA, Chance ML, Ellis JT (2000). «Evidence for a neotropical origin of Leishmania». Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95 (4): pp. 575-8. PMID10904417.
66. Organización Panamericana de la Salud. Epidemiología y Control de la Leishmaniasis en las Americas, por Pais o Territorio, 1996.
67. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis Actualizacion 2007, disponible en <http://ops-oms.org/> revisado en marzo 2010.
68. Pancer Z, Cooper MD (2006). «The evolution of adaptive immunity». Annual Review of Immunology 24: pp. 497–518. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090542. PMID16551257.
69. Pearson RD, de Quiroz Sous A. Leishmaniasis species: visceral cutaneous and mucosal, Leishmaniasis. In: Mandell GL, Benne JE, Dolin R (eds) Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and Practices of Infectious Diseases. Ed. 4th New York Churchill Livingstone, 1995 pp. 2428-42.
70. *Peres Merino Ines , Pozo Ugidos Sara*. Células que participan en la respuesta inmune contra parásitos, 2005; 42: 93 - 102
71. Pfaff, A.W., Candolfi, E. 2003. Immune responses to protozoan parasites and its relevance to diagnosis in immunocompromised patients. Eur. J. Protistol. 39:428-434.
72. Pastor Santiago JA, Chávez-López S, Guzmán-Bracho C, Flisser A, Olivio-Díaz A. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2012 Jan;86(1):108-14.
73. Peters, R., L. Stocken, and R. Thompson, British anti-Lewisite (BAL). Nature, 1945. 156: p. 616-9. Chemical Warfare Agents, 2nd Edition; Timothy C. Marrs, Robert L. Maynard, Frederick R. Sidell. 2007. ISBN 978-0-470-01359-5.
74. Rafael Ramiro de Assis, et al. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. Biochimica et

Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. Available online 7 November 2011. In Press, Corrected Proof.

75. Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrio J, Alberola J, Arboix M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol.* 84(1-2):33-47.
76. Roberts LH. Leishmaniasis [Clinical review: Science, medicine, and the future]. *British Medical Journal* 2000; 321 (7264): 801-804.
77. Rojas W, Anaya JM, Aristizabal B, Cano LE, Gomez LM, Lopera D, *Inmunologia de Rojas 2007; Corporación para investigaciones biológicas – Medellín Colombia; 378 - 390*
78. Rothemberg M., 1998. Mecanismo asociado a Eosinofilia. *New Engl J Med* 388: 1592 – 1599.
79. Rus H, Cudrici C, Niculescu F (2005). «The role of the complement system in innate immunity». *Immunologic Research* 33 (2): pp. 103–12. doi:10.1385/IR:33:2:103. PMID16234578.
80. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill. pp. 749–54. ISBN0838585299.
81. Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fauser I, Rebollar-Téllez EA. Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) mexicana in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *T Roy Soc Trop Med H, Jun* 2010;104(6):406-411. doi:10.1016/j.trstmh.2010.01.010
82. Schnian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, April 2011;138(4):405-425.
83. Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J., Ferrer L., 2000. The Ibizaian hound presents a predominant cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 90:37-45.

84. Sosa L. F. 2010. SP. en Inmunología. Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Instituto SELADIS- FCFB - UMSA.
85. Terry WD, Fahey JL. Subclasses of human g - globulin based on differences in the heavy polypeptide chains. Science 1964;146:400-1.
64. Uribarren T. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. berrueta@unam.mx.
87. Watson, J, D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth edition edición). San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.
88. Wortmann T , L Hochberg , Houg HH , Sweeney C , Zapor M , N Aronson , Weina P , Ockenhouse CF . Servicio de Enfermedades Infecciosas del Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC 20307-5001, EE.UU, 2011.
89. Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J.C. Ortiz-Ortiz, L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. Trends Parasitol. 18:271-278.0





ANEXOS

ANEXO 1

MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS EN EL PRESENTE TRABAJO

A. Insumos.-

1. Toma de Muestra.-

- Vacutainer
- Algodón
- Alcohol 70%
- Ligadura
- Tubos colectores con EDTA 7%
- Tubos colectores con Heparina
- Marcador indeleble
- Cuaderno de registro

2. Material de Vidrio y Plástico.-

- Microplacas de ELISA de 96 pozos de poliestireno
- Cajas de cultivo celular
- Pipeta Pasteur
- Cámara de Newbauer
- Tubos cónicos de poliestireno de 15 mL.
- Portaobjetos
- Pipetas
- Micropipetas y puntas

B. Equipos.-

- Microscopio óptico OLYMPUS (BH-2), Japón.
- Microscopio invertido OLYMPUS (CK-2), Japón.
- Centrífuga Hettich Zentrifugen Universal 32, Alemania.
- Microcentrífuga Hettich Zentrifugen MICKRO 22, Alemania.
- Refrigerador (4 y -20°C) White Watinghouse, Estados Unidos.
- Campana de flujo Gelaire BSB-4B, Flow Laboratories, Estados Unidos.

- Estufa a 37°C. 5% CO₂ y 99% HR, NUAIRE UN-8500E, Estados Unidos.
- Estufa a 26°C BINDER (BD-53).
- Lector de ELISA Bio-tec Instruments Inc, Estados Unidos.
- Mezclador térmico para microtubos Fisher Scientific, Estados Unidos.

C. Reactivos.-

- Medio de cultivo Schneider's Insects Medium, SIGMA.
- Medio de cultivo RPMI 1640, SIGMA
- Tampón Fosfato Salino (PBS) 0,01M; pH 7,2
- Tampón Versene (PBS 1X, 5nM EDTA)
- Medio de separación de Linfocitos (MP Biomedicals)
- Tampón Salino de Carbonatos
- Tampón Citrato Fosfato
- Solución de lavado (PBS-Tween)
- Ortofenildiamina (OPD)
- Glicerina Tamponada
- Solución Salina Fisiológica (0,9%)
- Carbonato de Sodio (2%)
- Hidróxido de Sodio (0,1N)
- Tartrato de Sodio y Potasio (2%)
- Sulfato de Cobre (1%)
- Aceite de Inmersión
- Preparación de placas (PBS-Tween BSA 0,1%)
- Solución Stop (PBS-BSA 0,1%)
- Anticuerpo Monoclonal anti IgG humano (SIGMA)
- Anticuerpo Monoclonal anti IgE humano (SIGMA)
- Tween 20 (0,05%)
- Percoll
- Buffer Acetato
- N-dimetilformamina (anticuerpos)
- Azul de Tripán
- Formol (1%)
- Tampón Fosfato Salino (PBS-IFI)
- Folan (1N)
- Albumina Suero Bovino (BSA)
- Tinción GIEMSA
- Penicilina 50U/MI
- Estreptomicina 50 mg/MI

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS 10x: (ELISA): 0.01 M.

❖	NaCl	2,5 gr.	
❖	Na ₂ HPO ₄	22,0 gr.	Na Cl 0,15 M
❖	NaH ₂ PO ₄	87,6 gr.	pH = 7,2 – 7,4
❖	H ₂ O	1000 mL.	

Citrato 0.1 M

❖	Citrato Sódico	21 gr.
---	----------------	--------

Fosfato 0,2 M

❖	Fosfato Disodico Hidratado	35,6 gr.	c.s.p. 1000 mL.
❖	NaH ₂ PO ₄ · 7 H ₂ O	49,95 gr.	c.s.p. 1000 mL.

Sustrato

❖	OPD	15 mg.
❖	Impón Citrato Fosfato	7,5 mL.
❖	H ₂ O	10 uL.

Tampón Carbonato – Bicarbonato: 0,1M; pH 9,6

Na ₂ CO ₃ (SIGMA)	3,2 g.
NaHCO ₃ (SIGMA)	5,9 g.
H ₂ O csp.	1000 mL

Solución de lavado PBS – Tween 20 al 0,05%

Tween 20 (SIGMA)	0,5 mL
PBS pH 7,4 csp.	1000 mL

Diluyente de suero y conjugado PBS – Tween 20 al 0,05% BSA 0,1%

BSA (fracción V – SIGMA)	0,1 g.
PBS – Tween 20 al 0,05% csp.	100 mL.

Solución de bloqueo PBS – BSA 0,1%

BSA (Fracción V – SIGMA)	0,1 g.
PBS pH 7,4 csp.	100 mL.

Tampón Citrato – Fosfato pH 5

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (SIGMA)	2,92 g.
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (MP-Biomedicals)	7,39 g.
H ₂ O csp.	500 mL.

Sustrato Ortofenildiamina (OPD)

(SIGMA)	22 mg.
Tampón Citrato	10 mL.
H_2O_2	18 uL.

Se preparó una solución de sustrato OPD 10 minutos antes de su utilización manteniendo la solución en oscuridad.

Polietilenglicol (PEG) al 12,5% (SIGMA)

Se preparó una solución de PEG al 12,5% para precipitar los complejos inmunes formados a partir de IgG presente en suero del paciente y el Ac anti-IgG humano.

Polietilenglicol (SIGMA)	6,25 g.
Solución Salina Fisiológica csp.	50 mL.

Reactivos del Método de Lowry

- ❖ Folan 2 N
- ❖ Tartrato de Sodio (Na) y potasio (K).
- ❖ Sulfato de Cobre
- ❖ Carbonato de Sodio (Na)
- ❖ Fosfato de Sodio (Na)
- ❖ Anti IgG e IgE conjugados con peroxidasa

ANEXO 3

PREPARACIÓN DEL MEDIO SCHNEIDER

- ❖ Pesar 1,636 gr. Medio Schneider
- ❖ Pesar 0,2 gr. Bicarbonato
- ❖ Disolver en 90 mL de H_2O destilada
- ❖ Luego añadir 10 mL de Suero Fetal Bovino
- ❖ Mas 500 uL de Penicilina (1.200.000) de inyectable disuelta en agua de ampolla.
- ❖ Mas 500 uL de Cefotaxima de inyectable disuelta en agua de ampolla.
- ❖ Posteriormente filtrar en campana de flujolaminar, con jeringa nueva y con filtros miliport.
- ❖ Guardar en frasco de vidrio etiquetado a 4°C.

ANEXO 4

DESCONGELACION Y CONGELACION DE PARASITOS

- ❖ Retirar del nitrógeno líquido el tubo falcón que contiene los parásitos
- ❖ Colocar en agua caliente (37°C)
- ❖ Luego colocar en 5 mL de Schneider
- ❖ Y posteriormente realizar el cultivo

- ❖ Preparar 5 mL de Schgneider
- ❖ Mas 1 mL de DMSO (Dimetil Sulfoxido)
- ❖ Y 4 mL de SFB (Suero Fetal Bovino)
- ❖ Luego filtrar (Crio Mix)
- ❖ Colocar todo el cultivo de parásitos en 2 tubos falcón
- ❖ Centrifugar a 2500 r.p.m.
- ❖ Eliminar el sobrenadante, y en un tubo dejar 500 uL.
- ❖ Mezclar uno de los tubos con 500 uL con el pelet y pasar al otro tubo
- ❖ Añadir el Crio Mix y alicuolar en 10 tubos Fisher.
- ❖ Primero a 4°C durante 30 minutos
- ❖ Luego a -20°C durante otros 30 minutos
- ❖ Y luego en nitrógeno líquido.

ANEXO 5

PROCEDIMIENTO DE SONICADO DE LOS PARÁSITOS

La Sonicación es el proceso por el cual se destruye a los parásitos por vibración, este procedimiento también se puede realizar congelando en hielo 3 veces a – 70°C.

Se debe realizar 10 ciclos de este proceso, en el cual cada ciclo dura 1 minuto de sonicación directa y 30 segundos de reposo.

- ❖ Primero la potencia de salida de 80 a 100 Herz.
- ❖ Pulzaciones / " = 2,5
- ❖ Prender el poder
- ❖ Prender el power 1' se apaga y luego se espera 30 " (10 ciclos)
- ❖ Una vez terminados los 10 ciclos se debe alicuotar en tubos.
- ❖ Luego centrifugar a 8200 r.p.m. durante 15 minutos
- ❖ Se los identificara como ASL (Antígeno Soluble Leishmania).
- ❖ Se debe guardar un tubo específico para la cuantificación.

ANEXO 6

CUANTIFICACION DE Ag. (Método de Lowry)

Sol. A. (Carbonato de Sodio al 2 %) NaOH 0,1 N.

- | | | | |
|---|--------------------------|---------|---------|
| ❖ | (Cart | 10 gr | 2 gr. |
| ❖ | Na_2CO_3 | | |
| ❖ | NaOH | 2 gr | 0,4 gr. |
| ❖ | H_2O | 500 mL. | 100 mL. |

Sol. B. (Tartrato de Na y K) al 2 %

- | | | | |
|---|----------------------|--------|---------|
| ❖ | T.S.P. | 1 gr. | 0,5 gr. |
| ❖ | H_2O | 50 mL. | 25 mL. |

Sol. C. (Sulfato de Cobre) al 1 %.

- | | | |
|---|---|---------|
| ❖ | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 gr. |
| ❖ | H_2O | 50 mL |

Sol. D.

- ❖ Folan 1 N.

Sol. E. (Solución de Trabajo)

- ❖ Preparar en el momento de utilizar
- ❖ Sol. A 200 mL
- ❖ Sol B 2 mL.
- ❖ Sol. C 2 mL.

Procedimiento

- Preparar solución stock de BSA (5mg/10mL).
- Preparar las soluciones estándar para la curva patrón.
- Marcar tubos de ensayo de la A hasta la G, los tubos para las muestras a analizar (trabajar por duplicado) y el blanco reactivo.
- Al tubo blanco reactivo añadir 200 uL de las soluciones estándar y las muestras a analizar donde corresponda.
- Añadir 3 ml de solución de trabajo (Sol. E) agitar en vortex y dejar reposar 10 minutos.
- Añadir 300 uL de Sol. D.
- Mezclar suavemente y dejar reaccionar por 30 minutos en oscuridad.
- Leer las absorbancias a 750 nm.
- Con los promedios graficar la curva patrón e interpolar las absorbancias de las muestras a analizar.

Curva STD.

(5mg / 10 mL)

	Dosis ug/mL	Stock BSA/uL	H Od (uL)
A	25	50	950
B	50	100	900
C	100	200	800
D	150	300	700
E	200	400	600
F	250	500	500
G	300	600	400

	Dosis ug/mL	ABS - 1	ABS - 2	X
A	25	0.000	0.007	0.003
B	50	0.038	0.044	0.041
C	100	0.080	0.078	0.079
D	150	0.161	0.157	0.159
E	200	0.198	0.193	0.195
F	250	0.253	0.247	0.250

G	300	0.285	0.289	0.287
M1		0.042	0.063	0.052

R = 0.99

$$Y = 0.001 X - 0.0153$$

$$X = 67.3 \text{ ug / mL.}$$

ANEXO 7

PROCEDIMIENTO DE TAPIZADO DE LAS PLACAS DE ELISA

IgE = 20 ug / MI

IgG = 10 ug / mL

IgE 1486 uL
 3514 uL

ASL
 Tampón Carbonatos

IgG 743 uL
 4257 uL

ASL
 Tampón Carbonatos

- ❖ Preparar IgE e IgG
- ❖ Colocar 100 uL en cada pozo, mitad de la placa de ELISA para IgE y la otra mitad para IgG.
- ❖ Agitar a 3,5 durante 30 minutos.

ANEXO 8

PROCEDIMIENTO DE POSTAPIZADO DE LAS PLACAS DE ELISA

El postapizado sirve para recubrir sitios en los que no se ha fijado el Antígeno.

BSA 0,1 % en PBS Tween 20 0,5 % (detergente y sirve como solución de lavado).
0,1 % / 100 mL

- ❖ 3 lavados con PBS Tween 0,5 %.
- ❖ 0,1 % BSA / 100 mL PBS Tween
- ❖ Luego el postapizado con 200 uL (0,1 BSA / 100 PBS Tween)
- ❖ 1 Hora a 37 °C
- ❖ Realizar 3 lavados

ANEXO 9

REALIZACION DE LA TÉCNICA DE ELISA

- ❖ Colocar diluyente de muestra PBS – BSA 0,1 %(dilución 1 / 21)
- ❖ Mas 10 uL de las muestras
- ❖ Sembrar 100 uL por pozo
- ❖ Incubar 1 hora a 37°C
- ❖ Realizar 3 lavados con PBS Tween 20
- ❖ Luego agregar el conjugado anti IgG (aliquotada con 25 uL con peroxidasa).
Realizar una dilución 1 / 600 (2 uL de conjugado + 1000 uL PBS – BSA)
- ❖ Sembrar 100 uL del conjugado.
- ❖ Luego incubar a 37°C durante 30 minutos
- ❖ Realizar 3 lavados

- ❖ Luego agregar 100 uL de sustrato (OPD diluido en tampón citrato + H₂O₂ – 10 volúmenes). Esto se debe preparar solo 15 minutos antes de utilizar. (10 mL de PBS + 18 uL de H₂O₂ + 22 ug de OPD).
- ❖ Incubar durante 30 minutos a 37°C.
- ❖ Añadir 50 uL de Solución de parada (H₂SO₄ – 3 N)
- ❖ Leer de 490 a 630 nm de longitud de onda.



ANEXO 10

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

El señor....., de años de edad y con C.I....
....., expedido en, manifiesta que ha sido informado sobre los beneficios que podría suponer la extracción de un volumen de 10 ml. de su sangre y un frotis de lesión (si presenta) para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación: **“DETERMINACION DEL VALOR PRONOSTICO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS IgE-ANTI LEISHMANIA COMO RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTI LEISHMANIA”** con el fin de brindar una herramienta más de apoyo al clínico que le permita tomar decisiones oportunas referidas al tratamiento y control de pacientes con leishmaniasis.

He sido informado de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de 10 ml de sangre y un frotis de lesión puede tener sobre mi bienestar y salud, así mismo se me hará conocer el resultado del las pruebas realizadas con mi muestra sanguínea.

He sido también informado de que mis datos personales serán protegidos según las Normas vigentes de Bioética.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción de sangre tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto de investigación antes mencionado.

La Paz,..... dede 2010.

Firma
DONANTE

Firma
PROF. DE SALUD

ANEXO 11

CÁLCULO DE CHI – CUADRADO

$$X_{\Sigma} = 100 + 63 + 58 + 5 = 226$$

$$X_{\Sigma} = 56,5 / 56,5 / 56,5 / 56,5 = 56,5$$

$$X = \frac{(o - e)}{e}$$

$$X^2 = \frac{(o - e)^2}{e} = 3,00$$

$X = ,00$	$> X$
$X_{\Sigma} = ,$	X_{Σ}

→ Acepta