

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Carrera de Bioquímica
Instituto SELADIS



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA Y DE
PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS DE LINFOCITOS PROVENIENTES
DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA DURANTE LA
GESTIÓN 2010 SELADIS F.C.F.B. LA PAZ, BOLIVIA**

Tesis de grado para obtener el título de Licenciatura en Bioquímica

Postulante: Univ. Fabiola Eliana Montes Cordero
Tutores: Dra. Jacqueline Calla de Magariños
Dr. Walter Magariños Loredo

La Paz –Bolivia
2011

DEDICATORIA

A mis amados papitos Arny y Flory quienes pusieron toda su confianza en mi...

A mi hermana adorada Shey...

A mi abuelito papi Vico...

A mis padrinos de "todo" como yo los llamo mami Ive y José Luis...

A mis primos queridos Ale y Andresito...

A mi amado esposo Leito...

Y con broche de oro, al impulso de mi vida...a ti hijita mía... Lucianita... porque todo en esta vida lo hacemos por ti mi amor... te ama... tu mami...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios nuestro señor, quien me prestó la vida para disfrutarla junto a mi familia y a las personas que me quieren y que yo amo.

A nuestra virgencita de Copacabana a quien le tengo mucha fe y devoción, y que nos llena de bendiciones.

A mis amados papis, por que pusieron toda su confianza en mí, y me brindaron todo su apoyo para que pudiera salir adelante por sobre todas las cosas.

A mis hermanos Sheyla, Alexandra y Andrés, porque siempre me pusieron como su ejemplo y espero no haberlos defraudado.

A mis padrinos Ivette y José Luis, porque me aconsejaron y confiaron en mí en todas las circunstancias de mi vida, y estuvieron a mi lado cuando necesité mucho apoyo.

A mi adorado abuelito David por que con sus enseñanzas de moral y principios ahora soy lo que soy.

A mi amado esposo por que sin su apoyo incondicional hoy no hubiera podido culminar este proyecto de vida, “gracias mi amor por ser como eres, porque sin ti la vida no sería igual, gracias mi vida por cuidar a nuestra hija cuando yo necesitaba tiempo y dedicación en mi trabajo, gracias por todo mi amor”.

A mi Lucianita, porque su llegada a este mundo cambió nuestras vidas y se convirtió en el motor de nuestra familia, tú eres la que nos impulsa a seguir adelante hijita adorada.

A la Dra. Jacqueline Calla y Dr. Walter Magariños, que compartieron sus conocimientos conmigo, quienes son profesionales ejemplares y me brindaron un gran apoyo tanto a nivel académico como calor humano, que fue fundamental en varios momentos de mi vida. Muchísimas gracias!

A mis grandes amigos Kary, Teddy, Dennis, Carlita y Mili por todo su apoyo incondicional.

Al Instituto SELADIS, laboratorio de Inmunología por abrirme sus puertas para que sea posible la realización de este trabajo, (porque el “labo de Inmuno” es nuestro segundo hogar gracias a Ud. Dra. Calla).

Al "Proyecto Enfermedades Infecciosas, Nuevas terapias: Evanta en el tratamiento de Leishmaniasis cutánea" DIPGIS/ASDI.

A todos quienes hicieron posible la culminación de mi trabajo...Muchas gracias.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA Y DE PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS DE LINFOCITOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA DURANTE LA GESTIÓN 2010 SELADIS F.C.F.B. LA PAZ, BOLIVIA

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. El agente se transmite al humano y a los animales a través de la picadura de hembras pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* de la familia Psychodidae. La Leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente de la enfermedad, se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunológicas. En la Leishmaniasis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de las células hospederas y se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la curación, en tanto que las citocinas que desactivan al macrófago se correlacionan con la afección, sin embargo estos mecanismos no están totalmente esclarecidos. Para poder comprender mejor estos mecanismos, se trabajó con células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea y controles aparentemente sanos, las cuales fueron cultivadas en presencia de antígeno de *Leishmania braziliensis*, donde los pacientes in tratamiento respondieron fuertemente a la prueba de proliferación celular comparadas con el grupo control estableciéndose diferencias estadísticamente significativas. En nuestro estudio se utilizó también Con A como estimulante, donde se observó que los pacientes respondieron al test de proliferación de manera similar al grupo control, pues se utilizó de un activador policlonal. La producción de citoquinas nos muestra que existe diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de INF- γ , IL-10 y TGF- β en respuesta al estímulo con el antígeno, no así en respuesta al estímulo con Con A por lo ya mencionado (excepto la producción de INF- γ).

Índice General

I. Introducción.....	1
II. Marco teórico.....	4
II.1. Epidemiología.....	5
II.1.1. Prevalencia de la leishmaniasis.....	6
II.2. El parásito Leishmania.....	8
II.2.1. Morfología.....	8
II.2.2. Ciclo biológico.....	10
II.2.3. Transmisión.....	12
II.3. Formas Clínicas de la leishmaniasis.....	13
II.3.1. Leishmaniosis visceral (LV) o kala-azar.....	13
II.3.1.1. Patología.....	15
II.3.1.2. Manifestaciones clínicas.....	16
II.3.2. Leishmaniosis mucocutánea (LMC)	17
II.3.2.1. Patología.....	17
II.3.2.2. Manifestaciones clínicas.....	17
II.3.3. Leishmaniasis cutánea.....	18
II.3.3.1 Patología.....	20
II.3.3.2. Manifestaciones clínicas.....	21
II.4. Inmunología.....	23
II.4.1. Generalidades.....	23
II.4.2. Citoquinas.....	23
II.4.2.1. Interferón Gamma (INF- γ).....	23
II.4.2.2. Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α).....	25
II.4.2.3. Interleucina 4 (IL-4).....	26
II.4.2.4. Interleucina 13 (IL-13).....	27
II.4.2.5. Interleucina 10 (IL-10).....	27
II.4.2.6. Factor de crecimiento transformante beta 1.....	29
II.4.3. Respuesta inmune frente a parásitos.....	30
II.4.3.1. Resistencia natural.....	31
II.4.3.2. Resistencia adquirida.....	32
II.4.4. Respuesta inmune frente a Leishmania.	32
II.5. Tratamiento.....	35
II.5.1. Glucantime.	36
II.5.1.1. Farmacodinamia y Farmacocinética en humanos.	36
II.5.1.2.Reacciones secundarias y adversas.....	36
II.5.1.3.Dosis y vía de administración.....	37
II.5.2. Anfotericina.....	37
II.5.2.1. Farmacodinamia y Farmacocinética en humanos.	38

II.5.2.2. Dosis y vía de administración.....	38
II.5.2.3. Reacciones adversas.....	39
III. Antecedentes.....	40
IV. Justificación.	44
V. Planteamiento del problema.....	46
VI. Pregunta de Investigación.....	47
VII. Diseño de Estudio.....	47
VII. 1. Descripción.....	47
VII.2. Tipo de Diseño.....	47
VIII. Objetivos.	47
VIII.1. Objetivo General.....	47
VIII.2. Objetivos Específicos.....	47
IX. Aspectos Éticos.....	48
X. Materiales y Métodos.....	49
X.1. Materiales.....	49
X.2. Reactivos.....	49
X.3. Equipos.....	49
X.4. Procedimientos.....	50
X.4.1.- Obtención de Antígeno de Leishmania.....	50
X.4.2. Cultivo de linfocitos de sangre periférica.....	50
X. 4.2.1 Estratificación Celular.	50
X.4.3. Viabilidad y Ajuste de la densidad celular.....	52
X.4.4. Cultivo celular.....	53
X.4.5. Test de MTT.....	54
X.4.6. Cuantificación de citoquinas producidas mediante la técnica ELISA.....	55
XI. Resultados.....	56
XI.1. Obtención del Antígeno de Leishmania.....	56
XI.2. Respuesta proliferativa en pacientes sin tratamiento versus controles.....	56
XI.2.1. Respuesta proliferativa inducida por antígeno de Leishmania <i>braziliensis</i>	57
XI.2.2. Respuesta proliferativa inducida por Concanavalina A.....	58
XI.3. Respuesta proliferativa en pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento.....	59
XI.3.1. Respuesta proliferativa inducida por antígeno de Leishmania <i>braziliensis</i>	59

XI.3.2. Respuesta proliferativa inducida por Concanavalina A.....	60
XI.4. Producción de Citoquinas en pacientes sin tratamiento versus grupo control.....	61
XI.4.1. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> (WHO 2305).....	62
XI.4.2. Producción de IL-10 bajo el estímulo de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	63
XI.4.3. Producción de TGF- β 1 bajo el estímulo de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> (WHO 2305).....	64
XI.4.4. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de Concanavalina A.....	66
XI.4.5. Producción de IL-10 bajo el estímulo de Concanavalina A.....	67
XI.4.6. Producción de TGF- β 1 bajo estímulo de Concanavalina A.....	68
XI.5. Producción de Citoquinas en pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento.....	69
XI.5.1. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	69
XI.5.2. Producción de IL-10 bajo el estímulo de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	70
XI.5.3. Producción de TGF- β 1 bajo el estímulo de antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	71
XI.5.4. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de Concanavalina A.....	72
XI.5.5. Producción de IL-10 bajo el estímulo de Concanavalina A.....	74
XI.5.6. Producción de TGF- β 1 bajo el estímulo de Concanavalina A.....	76
XII. Discusión.	78
XIII. Conclusiones.	83
XIV. Recomendaciones	85
XV. Bibliografía.	86

Índice de Figuras

	Pag.
Figura 1. Áreas de riesgo de Leishmaniasis en Bolivia.....	7
Figura 2. <i>Leishmania</i> sp. Promastigotes en cultivo. WHO/TDR/Summers. .	8
Figura 3. <i>Leishmania</i> sp. Amastigotes en macrófagos. CDC/NCID/DPD.....	9
Figura 4. Reconstrucción de tercera dimensión de una célula sin división de <i>Leishmania</i>	10
Figura 5. Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i>	11
Figura 6. Díptero del género <i>Lutzomyia</i>	12
Figura 7. Díptero del género <i>Phlebotomus</i>	12
Figura 8. Distribución de Leishmaniasis Visceral.....	14
Figura 9. Hepatoesplenomegalia. WHO/TDR/Desjeux.....	15
Figura 10. Leishmaniasis mucocutánea (WHO/TDR/Crump).	17
Figura 11. Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada. WHO/TDR/Crump.	19
Figura 12. Leishmaniasis cutánea. WHO/TDR/Mark Edwards.....	20
Figura 13. Leishmaniasis cutánea. CDC/Dr. DS Martin.....	20
Figura 14. Efectos de IL-10 en el balance Th1/TH2.....	29
Figura 15. Reacción inmunitaria a leishmania.	33
Figura 16. Estratificación celular	52
Figura 17. Cámara de New Bawer	53
Figura 18. Reacción química de MTT	54

Índice de Gráficas

	Pag.
Gráfica 1. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus controles estimulados con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> ...	57
Gráfica 2. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus controles estimulados con Concanavalina A	58
Gráfica 3. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento de Evanta estimulados con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	59
Gráfica 4. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A.....	61
Gráfica 5. Producción de INF- γ en pg/mL de pacientes sin tratamiento versus controles aparentemente sanos, estimulado con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	63
Gráfica 6. Producción de IL-10 estimulados con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> en pacientes sin tratamiento comparado con controles aparentemente sanos.....	64
Gráfica 7. Producción de TGF- β 1 estimulados con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> en pacientes sin tratamiento versus controles aparentemente sanos.....	65
Gráfica 8. Producción de INF- γ en pg/mL de pacientes sin tratamiento versus controles aparentemente sanos, estimulado con Concanavalina A.....	66
Gráfica 9. Producción de IL-10 estimulados con Concanavalina en pacientes sin tratamiento comparado con controles aparentemente sanos.....	67
Gráfica 10. Producción de TGF- β 1 estimulados con Concanavalina A en pacientes sin tratamiento versus controles aparentemente sanos.....	68

Gráfica 11. Producción de INF- γ en pg/mL de pacientes sin tratamiento versus pacientes cuyo tratamiento es Evanta, estimulado con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i>	69
Gráfica 12. Producción de IL-10 estimulados con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> en pacientes sin tratamiento comparado con pacientes con tratamiento de Evanta.....	70
Gráfica 13. Producción de TGF- β 1 estimulados con antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> en pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento de Evanta.....	71
Gráfica 14. Producción de INF- γ en pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A.....	73
Gráfica 15. Producción de IL-10 en pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A.....	75
Gráfica 16. Producción de TGF- β 1 en pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A.....	77

Lista de Abreviaturas

APC: Célula presentadora de antígeno
CD23: Fc epsilon RII, o FcεRII, anticuerpo isotipo implicados en la alergia y la resistencia a los parásitos, y es importante en la regulación de los niveles de IgE
CD28: glicoproteína de membrana de 44 KD
EAE: Extracto de Alcaloides de Evanta
IL-1: Interleuquina 1
IL-13: interleuquina 13
IL-2: Interleuquina 2
IL-4: Interleuquina 4
IL-5: Interleuquina 5
IL-6: Interleuquina 6
INF-γ: Interferón Gamma
KDa: Kilo Daltons
LCD: Leishmaniasis cutánea Difusa
LCL: Leishmaniasis cutánea Localizada
LMC: Leishmaniasis mucocutánea
LT CD4: Linfocitos T colaboradores
LT CD8: Linfocitos T citotóxico
LT: Linfocito T
LV: Leishmaniasis Visceral
MHCII: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II
NK: Natural Killer
TH1: Linfocito T helper 1
TH2: Linfocito T helper 2
TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral alfa
TNF-β: Factor de Necrosis Tumoral beta
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WHO: World Health Organization
IL-10: interleuquina 10
GMCSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
MIP-1α: macrophage inflammatory protein-1 alpha
TGF-β1: Factor transformante de crecimiento beta-1
CR1: Receptores de complemento tipo 1
R3: Receptores de complemento tipo 3
OMS: Organización mundial de la salud
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute
PBS: Phosphate Buffered Saline
ConA: Concanavalina A
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
TMB: Tetrametil bencidina
FoxP3+: Factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función de las células reguladoras T CD4+ humanas y murinas.

VIII. Introducción.

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* (familia Trypanosomatidae). Más de 15 especies de *Leishmania* son capaces de infectar al hombre, clasificados en dos grandes grupos: los del Viejo Mundo: *L. importante*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y el complejo *donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*) y del Nuevo Mundo: *L. mexicana*, *L. amazonensis* y complejo *Viannia* (por ejemplo, *L. brasiliensis*, *L. guyanensis*). (1)

La leishmaniasis es una zoonosis con reservorios importantes en animales. El parásito tiene un ciclo de vida digenético con una etapa de desarrollo extracelular en el insecto vector, la hembra del mosquito flebótomos y una etapa de desarrollo en los mamíferos, que es principalmente intracelular. En los flebótomos, el desarrollo del parásito se produce en el tubo digestivo con la formación de un móvil, flagelado y forma alargada denominada promastigote. El promastigote madura en el intestino medio del insecto en promastigotes metacíclicos infectantes. La inoculación en el hospedero mamífero se produce mediante la picadura de los dípteros del género Phlebotomus y Lutzomyia, que es un requisito para la oviposición. (1)

La distribución y las manifestaciones de la enfermedad varían mucho según la especie del parásito y la respuesta inmune subyacente del hospedero.

Un inóculo típico contiene alrededor de 100-1000 promastigotes metacíclicos que rápidamente son atacados por los leucocitos, especialmente los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Los parásitos se someten a una transformación aún más dentro de estas células para formar amastigotes. Un cambio morfológico ocurre cuando el parásito adquiere una forma ovoide con un flagelo corto, por lo tanto amastigote y, posiblemente, un cambio metabólico con un interruptor con el metabolismo anaeróbico en condiciones ácidas que se encuentran principalmente en el compartimiento del fagolisosoma. (1)

Según la organización mundial de la salud, hay cerca de 1 500 000 personas afectadas por las diversas formas de Leishmaniasis en todo el mundo, con una incidencia de 600 000 casos nuevos declarados cada año y distribuidos en 88 países. Estas cifras representan evidentemente una importante subestimación del problema debido a diferentes factores: lugares de transmisión muy dispersos, casos no diagnosticados o aquellos diagnosticados erróneamente y medicamentos específicos no disponibles.(1)

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de infectarse con parásito de Leishmania en 7 de 9 departamentos.(1)

Los tratamientos comúnmente empleados contra la leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral), incluyen los derivados pentavalentes de antimonio glucantime y pentostan, ketoconazol y algunos derivados imidazólicos, anfotericina B, sulfato de aminosidina y pentamidina.(1) Todos estos medicamentos presentan el inconveniente de ser mal tolerados por los pacientes provocando en ellos importantes efectos secundarios como fiebre, trastornos cardíacos, hepáticos y renales; en muchos casos es necesaria su hospitalización.(1)

Galipea longiflora Krause (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki.), utilizada como agente leishmanicida, tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta. Es un árbol de 3 a 4 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos. En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos del Beni y La Paz. El uso tradicional mas frecuente es en forma de cocción en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos. Para el tratamiento de la leishmaniasis, se utiliza la corteza fresca o seca, esta es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones

durante tres días. Este género cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y el Sur de Brasil (1)

Se ha establecido que la Respuesta Inmune es crucial en el control de esta parasitosis, por lo que pretendemos, a través de este estudio, establecer en primera instancia las características inmunológicas relacionadas a la capacidad de respuesta proliferativa, así como la producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea. Se pretende, también, evaluar el efecto de la administración de EAE (Extracto de Alcaloides de Evanta) en pacientes, tratados oral y tópicamente.



IX. Marco teórico.

La leishmaniasis es causada por especies de parásitos intracelulares del género *Leishmania*, los protozoos causantes de infección en el hombre pertenecen a la familia Trypanosomatidae, que tiene numerosas especies con igual morfología pero con diferencias en cuanto a la distribución geográfica, comportamiento biológico e inmunológico y características clínicas de la enfermedad. (2)

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado y del bazo. La enfermedad por su naturaleza zoonótica afecta tanto a animales, por ejemplo a perros como a humanos; sin embargo, animales silvestres como zarigüeyas, coatís y osos hormigueros entre otros son portadores asintomáticos del parásito, por lo que son considerados como animales reservorios.(2)

El agente se transmite al humano y a los animales a través de la picadura de hembras de los mosquitos “chupadores” de sangre pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* del viejo mundo y *Lutzomyia* del nuevo mundo, de la familia Psychodidae. (2)

Existen tres tipos de leishmaniasis: visceral (también llamada kala-azar), en la que varios órganos internos están afectados, la mucocutánea donde las manifestaciones clínicas se presentan muchos meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea y la cutánea, que se manifiestan principalmente en la piel. (2)

Actualmente, se consideran patógenas para el hombre las siguientes especies: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. archibaldi*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. amazonensis*, *L. garnhami*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. panamensis*.(2)

Las diferentes especies de *Leishmania* no se pueden identificar por su morfología. La clasificación se hace en función de sus características: 1) biológicas - morfología, desarrollo en el flebótomo, crecimiento en medios de cultivo, desarrollo en los hospederos vertebrados; 2) bioquímicas: patrones isoenzimáticos, análisis del DNA nuclear y del cinetoplasto; 3) inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales, entre otras.(2)

II.1. Epidemiología.

La leishmaniasis se encuentra distribuida en unos 100 países, en trópicos, subtrópicos y regiones templadas. Se considera que 350 millones de personas en el mundo están en riesgo de infección. La prevalencia estimada es de 12 millones de casos.(3)

La forma más frecuente en América es la cutánea. La enfermedad se asocia principalmente con la penetración o residencia cercana de grupos humanos en regiones selváticas; se han reportado casos en México, Centroamérica, Sudamérica, Estados Unidos (Texas), con la excepción de Chile, Uruguay e islas del Caribe.(3)

Las zonas geográficas situadas por debajo de los 1 750 m sobre el nivel del mar, con clima cálido, humedad relativa alta y temperatura media entre 25 - 30 °C presentan las condiciones adecuadas para la transmisión de la enfermedad cutánea y la proliferación de focos en bosques tropicales donde aún es frecuente la presencia de reservorios y vectores, en tanto que los bosques secos tropicales son el hábitat preferido para la leishmaniasis visceral.(3)

Los factores de riesgo en zonas endémicas son la exposición debida a actividades laborales (campesinos, militares, chicleros, madereros, arqueólogos); la instalación de viviendas cerca de focos de transmisión y de ciudades cercanas a bosques y/o selvas tropicales.

La coinfección con VIH+ se ha asociado a un incremento muy importante de la leishmaniasis visceral en zonas endémicas a nivel mundial. (3)

Los bolivianos que viven y/o desarrollan actividades laborales en las áreas tropicales y subtropicales de nuestro país; la gran inmigración de la zona andina a la tropical y la explotación predatoria del bosque tropical, son dos de las principales causas que están condicionando la aparición de nuevos focos de la enfermedad, haciendo que cada vez tengan mayor expansión geográfica y mayor magnitud cobrando notable importancia en la Salud Pública.(4)

II.1.1. Prevalencia de la leishmaniasis.

En los últimos 24 años (1983-2006), fueron registrados en el país 35 714 casos autóctonos de Leishmaniasis tegumentaria americana, menos de 10 casos de Leishmaniasis visceral y 4 casos de Leishmaniasis cutánea difusa. Comparando los casos reportados en 1983 que fueron 278, con los del año 2006 que fueron 2452, se observa que la tendencia de la Leishmaniasis está en aumento.(4)

El incremento de casos que se observa a partir del año 1983, tiene a la par, la expansión geográfica y el aumento de la enfermedad debido a los importantes movimientos poblacionales de colonización de nuevas áreas geográficas. A partir de 1990 los casos notificados pasan del millar de personas; el año 1998 se certifica la ocurrencia de casos en el departamento de Tarija, aumentando así el sexto departamento a la zona endémica de Bolivia y el año 2004 el número de casos notificados bordean los 2 800 personas; en todo este periodo se debe tomar en cuenta la existencia de sub registro de casos y la mayoría de las veces solamente la realización de detección pasiva de casos. (4)

El departamento de La Paz es el que notifica aproximadamente la mitad de casos reportados a nivel nacional; la gestión 2006 presentó 1 502 casos, (48 % del total), seguido del departamento del Beni con 889 casos (28 %) y Pando 416 casos (13 %). En el análisis de Municipios, los que mayor número de casos

sospechosos reportan en el 2006 son: Riberalta con 368 casos, Caranavi con 274 casos, Palos Blancos con 243 casos, la asunta con 163 casos, Chulumani con 113 casos y Cobija con 130 casos. (4)

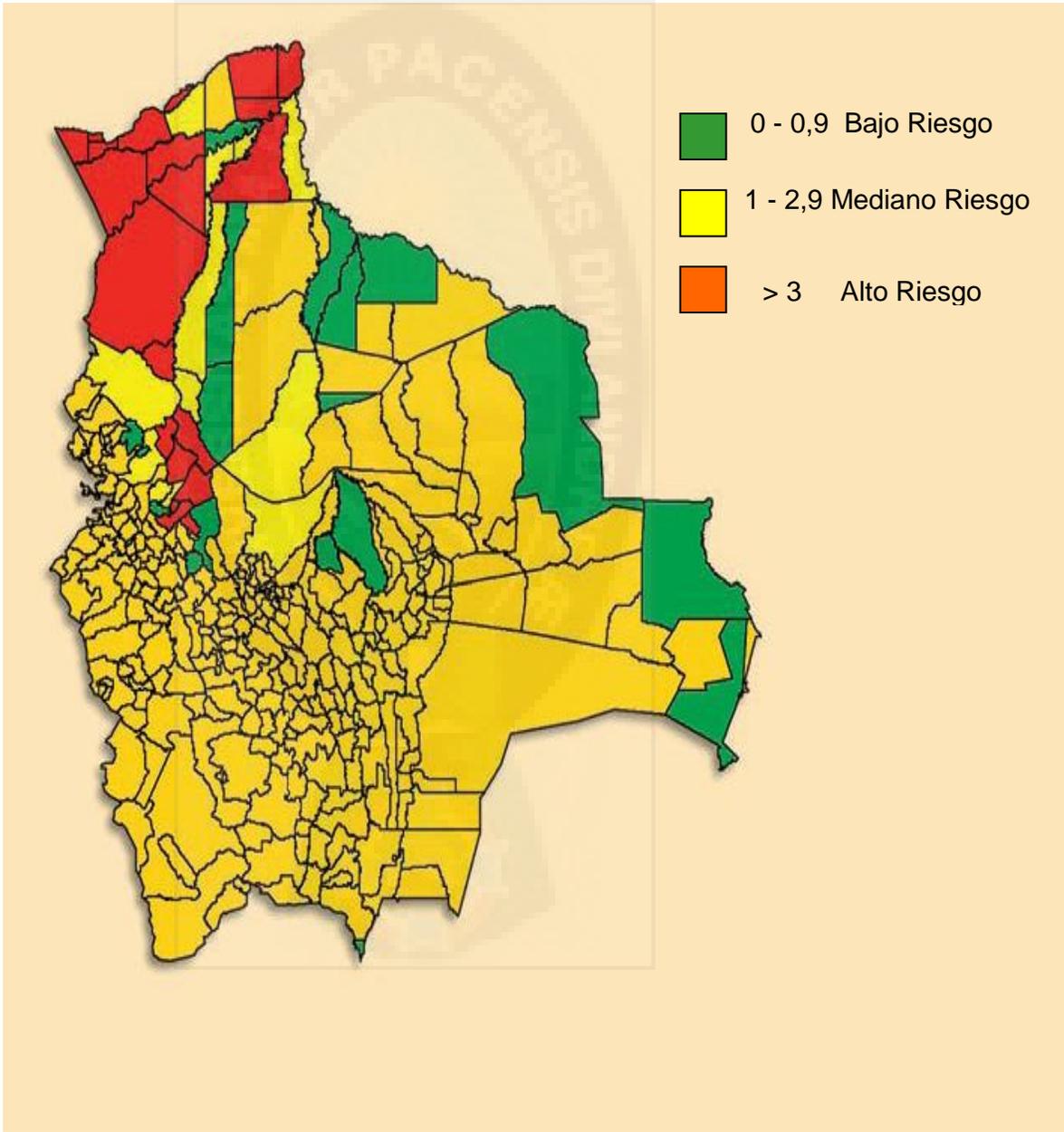


Figura 1. Áreas de riesgo de Leishmaniasis en Bolivia (4)

II.2. El parásito *Leishmania*.

II.2.1. Morfología.

Leishmania es un protozoo intracelular obligado dimórfico; en los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (células de Langerhans en la piel).

El promastigote (metacíclico), la forma infectante, elongado, extracelular, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores, pertenecientes al género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Mide 10 - 20 μm , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25 μm ; presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1 - 2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo. El axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar.(2)

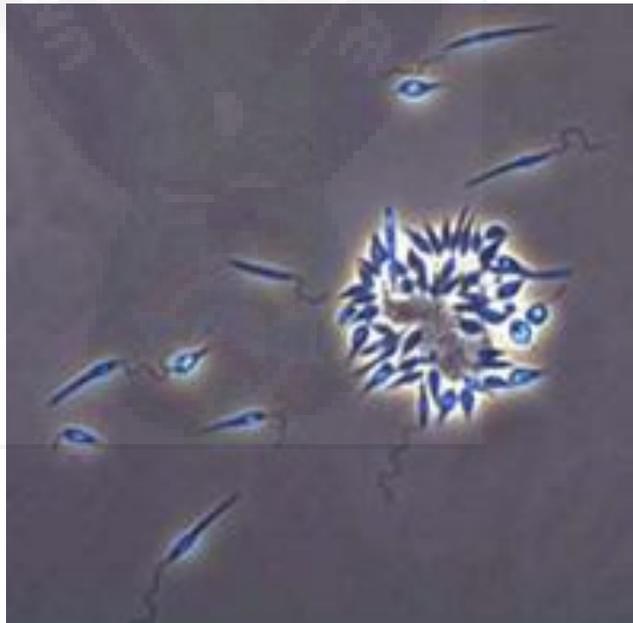


Figura 2. *Leishmania* sp. Promastigotes en cultivo.
WHO/TDR/Summers (2)

El amastigote, la forma replicativa, redondo u oval, intracelular, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel. (Laskay T, *et al.* 2003). Mide 2 - 4 μm ; con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura y un filamento delgado que une cinetoplasto y cuerpo basal, éste último apenas un punto visible.

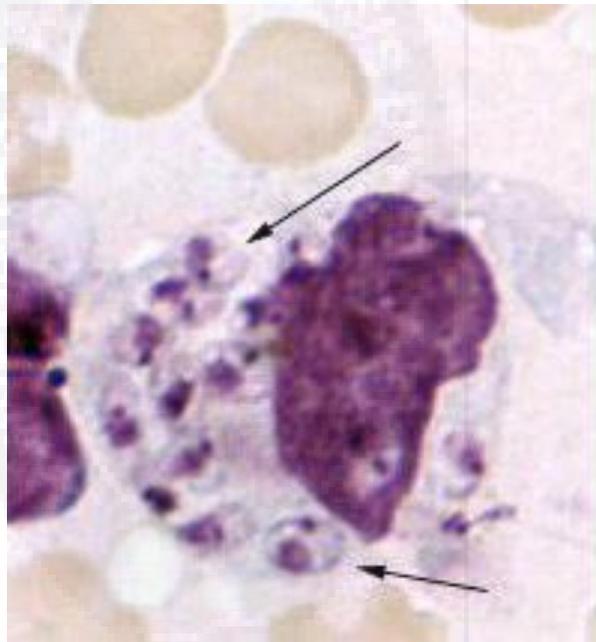


Figura 3. *Leishmania* sp. Amastigotes en macrófago.
CDC/NCID/DPD. (2)

El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. La presencia del cinetoplasto da el nombre al grupo de protozoos incluidos en el orden *Kinetoplastida*. (2)

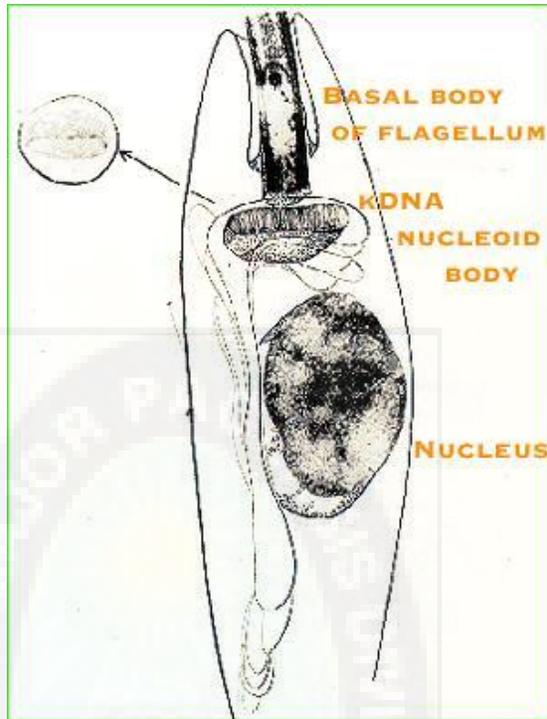


Figura 4. Reconstrucción de tercera dimensión de una célula sin división de Leishmania.(5)

II.2.2. Ciclo biológico.

Los parásitos del género *Leishmania* tienen fundamentalmente dos estadios en su ciclo de vida: la forma promastigote flagelada extracelular que se desarrolla y madura dentro del intestino del insecto vector (*Phlebotomus spp.* En el viejo mundo y *Lutzonimia spp.* En el nuevo mundo) y la forma amastigote intracelular en el hospedador vertebrado.(6)

En los huéspedes vertebrados los amastigotes se reproducen intracelularmente por división binaria y al romper las células invaden rápidamente otras. Al picar la hembra vectora en la piel del vertebrado, se forma una lesión en la dermis en donde están los parásitos, este material es succionado y llega a la luz del tubo digestivo del mosquito; allí los parásitos se alargan, desarrollan rápidamente el flagelo y constituyen las formas móviles o promastigotes. Existe

predilección de ciertas especies de *Leishmania* para reproducirse en diferentes partes del tubo digestivo del vector.(6,7)

Los promastigotes infectantes migran a la parte anterior del insecto hasta que son inoculados en la picadura de un nuevo huésped. El tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente de 10 días. Al penetrar los promastigotes por la piel, invaden las células histiocitarias y en su interior se transforman en amastigotes. (6,7)

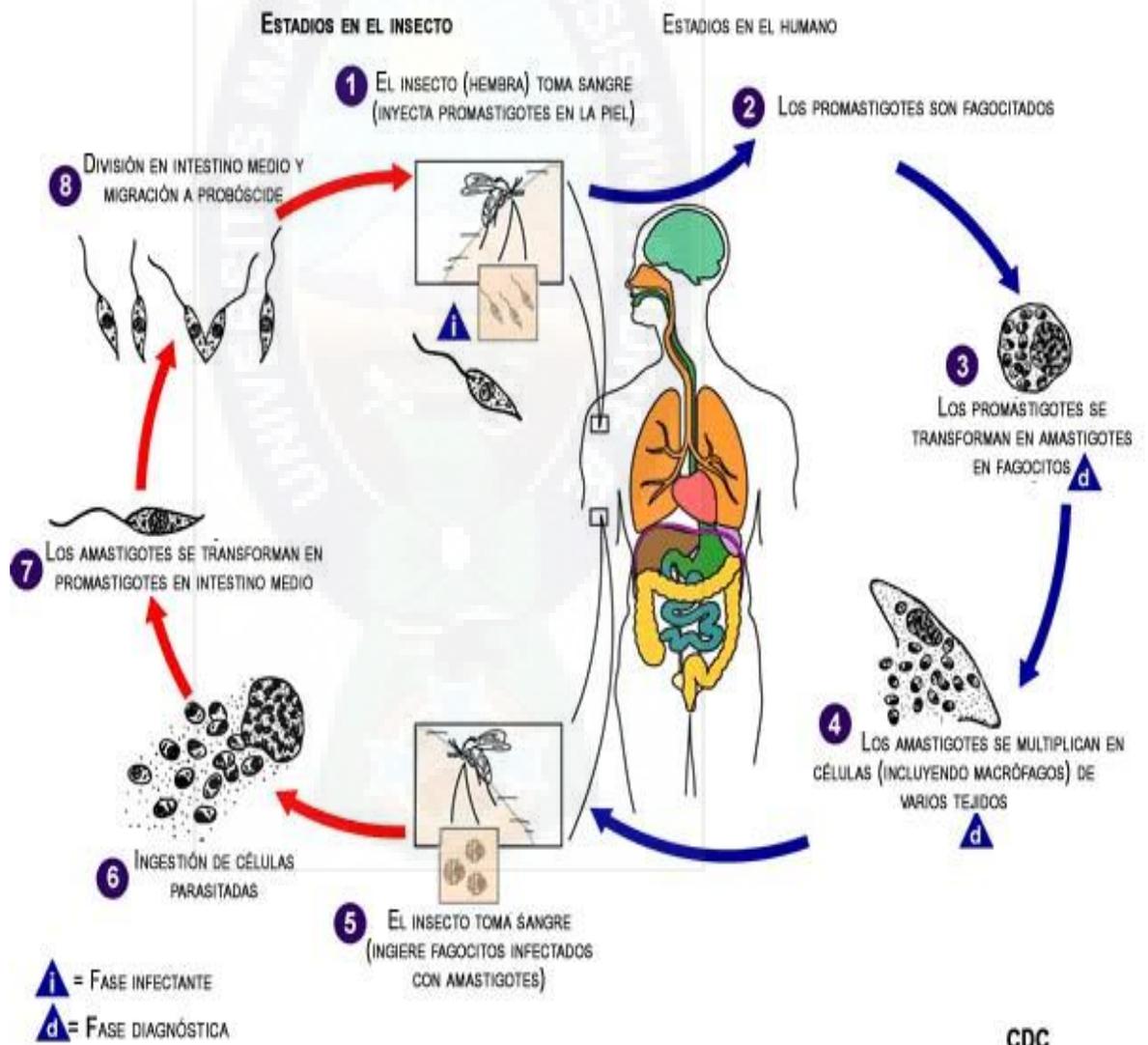


Figura 5. Ciclo Biológico de *Leishmania* (8)

II.2.3. Transmisión.

La picadura por dípteros del género *Lutzomyia*, en América, es el principal mecanismo de transmisión. Estos insectos pueden adquirir la infección de humanos y reservorios tales como roedores, cánidos y primates. La transmisión entre humanos también puede ocurrir por contacto con material de una lesión, trasplante de órganos, transfusión sanguínea y a través de la placenta.



Figura 6. Díptero del género *Lutzomyia longipalpis*. WHO/TDR/Stammers (2)



Figura 7. Díptero del género *Phlebotomus sp.* CDC/ Frank Collins (2)

Los flebótomos transmisores son pequeños, miden 1.5 - 2.5 mm y están cubiertos de pelos. Se cree que un 10% de las 600 especies conocidas está involucrado en la transmisión de la leishmaniasis humana. La hembra requiere de sangre para la maduración de los huevos, en tanto que los machos se alimentan del jugo de frutos. Sustancias presentes en la saliva, como la maxaladina, se han relacionado en parte con el tropismo de los aislados de *Leishmania*.(2)

Se ha intentado prevenir la enfermedad con repelentes de insectos aplicados a toldillos en la época de mayor riesgo de contagio con resultados dispares.

II.3. Formas Clínicas de la leishmaniasis.

Como se ha mencionado precedentemente, existen tres tipos de leishmaniasis: visceral (también llamada kala-azar), en la que varios órganos internos están afectados, mucocutánea donde las manifestaciones clínicas se presentan muchos meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea y cutánea, que se manifiestan principalmente en la piel.

II.3.1. Leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar.

El 90% de los casos se ha reportado en Bangladesh, India, Nepal y Sudán.(2)

Los parásitos que causan la L.V. pertenecen al complejo *Leishmania donovani*, el cual incluye las especies *L. donovani* en el subcontinente hindú, Asia y África, *L. infantum* en el Mediterráneo y *Leishmania infantum/ L.chagasi* en Suramérica. La Leishmaniasis visceral es de amplia distribución geográfica, tanto en el continente americano como en el europeo y el asiático (Figura 8). La incidencia anual mundial es de 500 000 casos viscerales y 59 000 muertes cada año debido a esta forma de leishmaniasis. (9)



Figura 8. Distribución de Leishmaniasis Visceral.

La infección puede ser asintomática, aguda o crónica. En países en desarrollo, los niños con algún grado de desnutrición y los sujetos HIV positivos son la población en mayor riesgo de adquirir la enfermedad progresiva. El tiempo de incubación es de meses, a veces años.

La aparición de signos y síntomas es habitualmente insidiosa, y en ocasiones, en el sitio de la agresión se desarrolla un nódulo permanente, como único signo inicial, los cuadros agudos son menos frecuentes. Cuando se manifiesta la enfermedad, es grave y la mortalidad sin tratamiento es del 100%.(2)

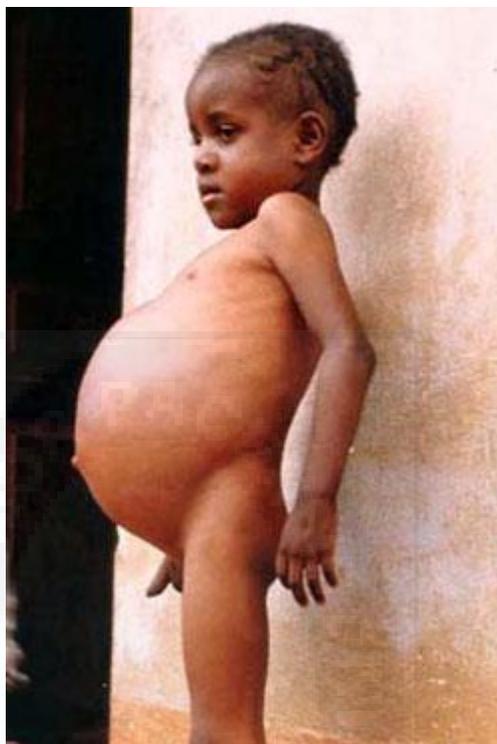


Figura 9. Hepatoesplenomegalia. WHO/TDR/Desjeux (2)

Las características generales de la enfermedad son fiebre irregular, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia; entre los signos y síntomas en niños se presentan fiebre, palidez, anorexia, pérdida de peso, deficiencia en el crecimiento, tos, vómito, diarrea y epistaxis; esplenomegalia masiva acompañada de hepatomegalia, linfadenopatías, a veces generalizadas, sangrado gingival, equimosis y petequias en extremidades. El bazo grande, firme, puede aparecer con consistencia blanda en casos agudos.

II.3.1.1. Patología.

En los casos en que se ha comprobado la puerta de entrada del parásito, se encuentra que la piel presenta una lesión inflamatoria localizada. Los histiocitos tienen numerosos amastigotes intracelulares, en algunos casos se ha informado lesión ulcerativa en el sitio de entrada del parásito.(6)

Los ganglios linfáticos regionales están aumentados de tamaño y también contienen parásitos. Al diseminarse, se compromete todo el sistema reticuloendotelial del organismo. Los órganos más afectados son: bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos. (6)

El bazo crece y puede alcanzar un peso hasta de 3500 gramos, toma un color gris, se vuelve nodular y la cápsula se distiende, el hígado también está crecido y con hiperplasia reticuloendotelial. Las células de Kupffer están llenas de parásitos y hay infiltrado de células mononucleares y eosinófilos en las áreas portales. En la médula ósea existe hiperplasia del sistema retículo endotelial y se observan abundantes amastigotes intracelulares; hay muchos megacariocitos pero con poca actividad productora de plaquetas. Los ganglios linfáticos están generalmente crecidos, en especial los mesentéricos, que son los más frecuentemente invadidos. (6)

II.3.1.2. Manifestaciones clínicas.

Después de la picadura del vector, existe un período de incubación que varía entre 4 a 10 meses, aunque pueden existir períodos más cortos o más largos. En muy pocos casos se encuentran lesiones en la puerta de entrada, pues la mayoría pasan desapercibidas; éstas consisten en una pequeña reacción inflamatoria con cambios de hiper pigmentación. En algunos casos la infección cursa en forma asintomática, lo cual es frecuente en algunas áreas. Cuando ocurre la invasión visceral, se inicia la fiebre irregular, casi siempre progresiva y elevada, remitente o intermitente que dura semanas y se altera con períodos afebriles. Posteriormente la fiebre es persistente y ondulante. (6)

El bazo crece gradualmente y sobrepasa el reborde costal. En la fase crónica la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa iliaca derecha, el hígado crece también pero la hepatomegalia no es tan intensa.

II.3.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)



Figura 10. Leishmaniasis mucocutánea (WHO/TDR/Crump) (2)

Las manifestaciones clínicas se presentan muchos meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea; se deben a metástasis de lesiones cutáneas, aunque en un porcentaje de los casos no es posible identificar la lesión primaria.

II.3.2.1. Patología.

Las lesiones se inician principalmente en mucosa nasal, simulando en el inicio una rinitis. Se aprecia inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso. El progreso de la enfermedad es crónico.

II.3.2.2. Manifestaciones clínicas.

Puede involucrar el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe, laringe y tráquea. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar, deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia. La infección secundaria es frecuente y complica el cuadro.

Presenta resistencia a la quimioterapia específica, no es usual en niños, pero cuando ocurre la mortalidad es alta. Las lesiones presentan escasos parásitos.(2)

II.3.3. Leishmaniasis cutánea.

Es la forma más frecuente de la enfermedad, se encuentra en África, el subcontinente Indio,, Latinoamérica, sur oeste de Asia y en parte de los países mediterráneos.

La leishmaniasis cutánea se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas, histopatológicas, inmunológicas, (Convit, 1974). Diferentes estudios tanto en modelos experimentales como en humanos han demostrado que la inmunidad mediada por células está relacionada con la resistencia y susceptibilidad en esta enfermedad.(6)

Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmune celular protectora y leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la diseminación no controlada en piel, presenta lesiones nodulares con gran número de parásitos, diseminadas prácticamente en todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, regiones inguinal y axilar, genitales externos, plantas y palmas, aunque se han reportado excepciones. La enfermedad es de curso crónico, se presentan resistencias a los tratamientos. Se asocia a recaídas, infecciones bacterianas secundarias.

Se considera un problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica y porque puede llegar a producir lesiones destructivas e incluso discapacitantes.

El espectro de la Leishmaniasis cutánea incluye individuos inmunorespondedores con Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), caracterizados por presentar una respuesta inmune celular adecuada y lesiones bien definidas.(6)

Por otro lado, se encuentran individuos no respondedores con Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la cual es de frecuencia muy baja y se caracteriza por presentar una alergia selectiva frente al parásito la cual conduce a la diseminación del mismo.(6)

La lesión inicial es una pápula que evoluciona a un nódulo eritematoso, pruriginoso e indoloro, acompañada hasta en un 30% de los casos de adenopatía regional, con un diámetro de 1 - 10 cm y que se ulcera en un lapso de 1 - 3 meses. La úlcera característica es redondeada, de borde elevado y bien definido, indurado, cubierta por una costra amarillenta; cuando ésta se desprende revela un fondo de tejido de granulación limpio.

Es posible que aparezcan lesiones satélites. Con alguna frecuencia existe infección secundaria, con lesiones purulentas y dolorosas. En ocasiones no hay ulceración y se aprecian en su lugar lesiones vegetantes o verrucosas. El cuadro tiende a curar espontáneamente a corto o largo plazo, dejando como secuela una cicatriz visible como una placa atrófica y discrómica con telangiectasias.(2)



Figura 11. Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada. WHO/TDR/Crump.(2)



Figura 12. Leishmaniasis cutánea. WHO/TDR/Mark Edwards(2)



Figura 13. Leishmaniasis cutánea. CDC/Dr. DS Martin (2)

II.3.3.1 Patología.

En la lesión correspondiente a la entrada del parásito se inicia una reacción inflamatoria, en el tejido conectivo y se forma una pápula. Al desarrollarse la inmunidad se produce necrosis de la dermis y ulceración. Las células histiocitarias invadidas pueden contener varios amastigotes; estos rompen las células y quedan

extracelulares antes de invadir nuevos histiocitos. Los parásitos se diferencian de otros microorganismos intracelulares, por la presencia de núcleo y cinetoplasto. El infiltrado existente está compuesto por plasmocitos, linfocitos y células gigantes. En las lesiones antiguas, ciertos pacientes forman un granuloma con infiltrado tuberculoide; hay fibrosis y existen pocos parásitos o no se encuentran, por lo que se informa como granuloma inespecífico. (6)

La mayoría de las lesiones se encuentran en la piel y ocupan el corion, incluyendo las papilas. Existe atrofia cutánea y desaparición de la epidermis. También se observa acantosis y algunas veces aparecen vegetaciones. Los parásitos invaden fácilmente los conductos linfáticos, donde producen linfangitis y linfadenitis.(6)

En la invasión mucocutánea, además de las lesiones ulcerativas, se presentan cordones epiteliales que entran profundamente en la dermis. La mucosa muestra reacción infiltrativa y ulcerativa, similar a la ya descrita. En las formas anérgicas o difusas no hay necrosis ni granulomas y los parásitos se multiplican en gran cantidad dentro de los histiocitos o macrófagos.(6)

II.3.3.2. Manifestaciones clínicas.

La picadura del vector es muy dolorosa, en algunas ocasiones se encuentra la asociación entre la picadura y la aparición de la lesión. Después de un período de incubación que varía entre 2 semanas y 2 meses o más aparece la lesión inicial que puede ser única o múltiple. Las localizaciones más frecuentes están en extremidades y en la cara. Respeto generalmente las palmas, plantas y cuero cabelludo. La lesión inicial consiste en una mácula eritematosa, que luego se convierte en una pápula o pústula, cuya base es firme, indurada e hiperémica, algunas veces pruriginosa, que crece lentamente. Después de varios días se ulcera y se recubre de un líquido amarillento y adherente que posteriormente da lugar a la costra. Debajo de la costra, la ulceración se extiende en superficie y

profundidad, además aparecen lesiones satélites que pueden unirse a la inicial y dan lugar a una gran ulceración. La úlcera característica es generalmente redondeada, indolora, con bordes bien definidos y cortados en forma de sacabocado; este borde es hiperémico, levantado e indurado. Cuando se desprende la costra se observa un fondo granuloso, limpio, que exuda líquido no purulento. Después de algunos meses la lesión llega a medir varios centímetros y con frecuencia los parásitos invaden los cordones linfáticos y producen linfangitis y linfadenitis regional, lo cual se palpa como un rosario o cadenas de ganglios. Por la diseminación linfática, hemática o autoinoculación por rascado, algunas veces a parecen lesiones a distancia.(6)

Algunas lesiones cutáneas curan espontáneamente en varios meses dejando cicatrices visibles, pero la mayoría de las úlceras tienen un curso crónico de meses o años. Con frecuencia las úlceras se infectan secundariamente con bacterias, lo cual hace la lesión purulenta y algunas veces dolorosa. En ciertos individuos, especialmente la raza negra, las lesiones se vuelven vegetantes o verrucosas. En formas muy crónicas, de varios años de evolución, existe reacción fibrosa y algunas veces hay deformaciones o mutilaciones. Esta última manifestación puede suceder en el pabellón auricular. (6)

En otros casos la enfermedad evoluciona hacia una forma impetigiosa o infiltrativa, no ulcerada, como ocurre con la leishmaniasis tegumentaria difusa o leproide, en la que se encuentran alteraciones del sistema inmunitario, con intradermorreacción negativa y abundantes parásitos en las lesiones.(6)

La complicación de mayor consideración es el compromiso de mucosas, la cual puede estar restringida a estas o extenderse a la piel contigua. Aparecen generalmente después de varios meses de iniciada la lesión cutánea y aún después de su cicatrización.(6)

II.4. Inmunología.

II.4.1. Generalidades.

Los virus, bacterias y parásitos son agentes infecciosos capaces de ejercer diversas interacciones con los hospederos que infectan, algunas de las cuales afectan a células, tejidos y órganos manifestando el poder patógeno que poseen. En este tipo de interacciones, que conducen al desarrollo de la enfermedad, participan factores propios del agente infeccioso, del hospedero y del ambiente en el que actúan. Los factores dependientes del hospedero ejercen su acción a través de mecanismos de inmunidad natural o inespecíficos y de mecanismos específicos o de inmunidad adaptativa. (10)

Entre los mecanismos de inmunidad natural o inespecíficos, que tienen importancia en el control de las infecciones están: la fagocitosis, la acción del sistema de complemento células NK, las barreras cutáneas y de las superficies epiteliales y otros. (10)

Los mecanismos de inmunidad específica tanto humoral como celular serían de escasa o nula utilidad si no contaran con los mecanismos de inmunidad natural.(10)

La evolución de las enfermedades infecciosas comprende una secuencia de interacciones entre el microorganismo y su hospedero. Éstas incluyen: entrada, invasión y colonización de los tejidos por el microorganismo, evadiendo al mismo tiempo los mecanismos inmunes del hospedero.(10)

II.4.2. Citoquinas.

II.4.2.1. Interferón Gamma (INF- γ).

El IFN-gamma se produce principalmente por las células T y células asesinas naturales activadas por antígenos, mitógenos o aloantígenos. Es producida por

los linfocitos que expresan los antígenos de superficie CD4 y CD8 . La síntesis de IFN-gamma se induce, entre otras cosas, por la IL-2 .

La síntesis de IFN-gamma es inhibida por dexametasona y ciclosporina (ciclosporina A), las células B también producen IFN-gamma. (11,12,13)

El IFN-gamma tiene actividad antiviral y antiparasitaria y también inhibe la proliferación de una serie de células, el IFN-gamma tiene sinergismo con TNF-alfa y el TNF-beta en la inhibición de la proliferación de diversos tipos de células . Las actividades inhibitorias del crecimiento de IFN-gamma son más pronunciadas que las de los demás interferones. Sin embargo, la actividad biológica principal de IFN-gamma parece ser inmunomoduladora en contraste con los otros interferones que son principalmente antivirales. (11,12,13)

En las células T-helper, IL-2 induce la síntesis de IFN-gamma y otras citocinas . IFN-gamma actúa sinérgicamente con IL1 y la IL-2 y parece ser necesario para la expresión de IL-2 receptores en la superficie celular de los linfocitos T . El bloqueo del receptor de IL-2 por los anticuerpos específicos que también inhibe la síntesis de IFN-gamma. IFN-gamma por lo tanto influye en los mecanismos mediados por células de la citotoxicidad. IFN-gamma es un modulador de las células T, funcionalmente, crecimiento y diferenciación . Se trata de una promotora de factor de crecimiento de los linfocitos T y potencia la respuesta de estas células con mitógenos o factores de crecimiento . (11,12,13)

Las células T reactivas pueden estimular la producción de INF- γ ; cuando los linfocitos que están en circulación, entrando y saliendo de órganos linfoides periféricos (recirculación linfocitaria), lo hacen en un estado de reposo de su ciclo celular (Go). Cuando se encuentran con una APC en órganos linfoides periféricos y éstas les presentan al antígeno que es reconocido por su receptor específico, comienza la fase de activación. Se inicia una serie de fenómenos que van desde la salida del estado de reposo del ciclo celular, la entrada en fase proliferativa o de

expansión clonal, síntesis de citoquinas y de receptores de citoquinas, diferenciación a células efectoras y de memoria. (14)

El CD28 transmite señales al LT que estimulan su respuesta al antígeno, la producción de citoquinas como la IL-2 y la diferenciación del LT virgen a LT efector y células de memoria. Las respuestas más tempranas de la activación linfocitaria son la secreción de citoquinas y la expresión de nuevas moléculas de superficie en LT, por lo que denominan marcadores de activación. La presencia de IL-12, secretada por la APC, estimula la respuesta celular TH1, productora de INF- γ . El grupo TH2 se estimula por la presencia de IL-4 y secreta en forma característica IL-4 e IL-5. Cada subpoblación se amplifica a sí misma e inhibe a la otra. La principal función efectora de LT TH1 con la producción de INF- γ es la estimulación del macrófago para promover la destrucción de organismos intracelulares, pero también estimular la producción de anticuerpos con capacidad opsónica y de activar el complemento, proceso que también permite una mayor capacidad fagocítica,(14)

II.4.2.2. Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es miembro de un grupo de otras citocinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria, está relacionado con los glóbulos blancos de la sangre, el endotelio y otros tejidos en el transcurso de distintas agresiones celulares como por ejemplo las infecciones. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como la interleucina 1 y endotoxinas bacterianas. El TNF ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores como las interleucinas 1 a la 6. (15)

La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B.

También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre. Las funciones del TNF se deben a su unión a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en diferentes células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Además estos receptores se encuentran en estado solubles en el suero y en el líquido sinovial. Aunque localmente los efectos del TNF- α son beneficiosos, cuando el TNF actúa por todo el organismo sus efectos son desastrosos provocando síndromes como el shock séptico y la coagulación intravascular diseminada. (15)

II.4.2.3. Interleucina 4 (IL-4).

La interleucina-4 (IL-4) es una glucoproteína del grupo de las citocinas, que pesa unos 20 kDa y producida por las células T de tipo 2 (Th2), basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. Actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF-alfa, IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago. Es una citocina muy pleiotrópica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Posee efectos inmunosupresores, ya que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios de los macrófagos e induce la producción de IL-1Ra, que bloquea la acción de la IL-1. Por otra parte, promueve el desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B, produciendo el cambio isotípico hacia IgG4 e IgE e incrementando la expresión de moléculas CD23 en linfocitos B, basófilos y eosinófilos. Por todo ello, los efectos de esta citocina se han relacionado con el desarrollo de los procesos alérgicos y con el incremento de IgE en las infecciones parasitarias.(16,17)

II.4.2.4. Interleucina 13 (IL-13).

La interleucina 13 es una citoquina recientemente descrita producida por linfocitos TH2. Su principal papel fisiológico está relacionado con la supresión de las funciones citotóxicas e inflamatorias de los monocitos/macrófagos, lo que indica que puede ser un potente modulador de la respuesta inmune in vivo. Además, ejerce una función importante en el control de la inmunorreactividad de los linfocitos B (potencia la expresión de CD23, MHC-II e Induce la síntesis de IgE e IgG4). El gen de la IL-13 humana se encuentra ubicado en el cromosoma Sq23-31, adyacente a los genes que codifican para la IL-4 y otros factores de crecimiento hematopoyéticos e inmunorreguladores como la IL-3, GM-CSF e IL-S. En particular la IL-13 comparte con la IL-4 y la IL-10 la habilidad de Inhibir en los macrófagos humanos la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 α ., IL-1 β , IL-6, TNF- α ., IL-8 y MIP-1 α .. Estos datos indican la importancia de esta citoquina en la inmunorregulación de procesos Inflamatorios, alérgicos y autoinmunes.(16,17)

II.4.2.5. Interleucina 10 (IL-10).

Interleucina (IL) -10 es una citoquina importante inmunorreguladora, producida por muchas poblaciones de células. Su función biológica principal parece ser la limitación y la terminación de la respuesta inflamatoria y la regulación de la diferenciación y la proliferación de varias células inmunes como las células T, células B, células asesinas naturales, células presentadoras de antígeno, los mastocitos y granulocitos. Sin embargo, datos muy recientes sugieren que la IL-10 también interviene en las propiedades inmunoestimulantes que ayudan a eliminar las partículas infecciosas y no infecciosas con inflamación limitada. Numerosas investigaciones, incluyendo análisis de expresión en los pacientes, en experimentos in vitro y en animales sugieren un impacto importante de la IL-10 en las enfermedades inflamatorias, malignas y autoinmunes.(18)

Las células presentadoras de antígeno y los linfocitos son los objetivos principales de la IL-10. Los efectos directos en estas poblaciones se explica el gran impacto inmunológico de esta citocina, incluyendo la regulación del balance Th1/Th2 (Imagen 13). Las células Th1 se sabe que son esenciales para la eficacia de la inmunidad mediada por células (lisis de las células T citotóxicos (CTL), la inflamación mediada por células, complemento / anticuerpos Fcγ-R enlace), en particular, frente a los organismos intracelulares, mientras que las células Th2 (o tipo 2) de citoquinas patrón es especialmente responsable de la producción efectiva de la IgE, IgA e noncomplement /-R vinculante IgG Fc, en particular, para neutralizar los microorganismos y sus toxinas y de inmunidad de la mucosa. IL-10 promueve el desarrollo de un patrón de citoquinas tipo 2 mediante la inhibición de la producción de IFN-γ de los linfocitos T en particular a través de la supresión de la síntesis de IL-12 en las células accesorias. De acuerdo con esto, la IL-10 costimulates la proliferación y diferenciación de las células B, que es importante para la adecuada defensa contra los parásitos intestinales, la neutralización de las toxinas bacterianas y en defensa de la mucosa local. Por otra parte,-10 suprime la producción de citoquinas proinflamatorias Por lo tanto, la IL-10 representa un importante supresor de la inmunidad celular. (18)

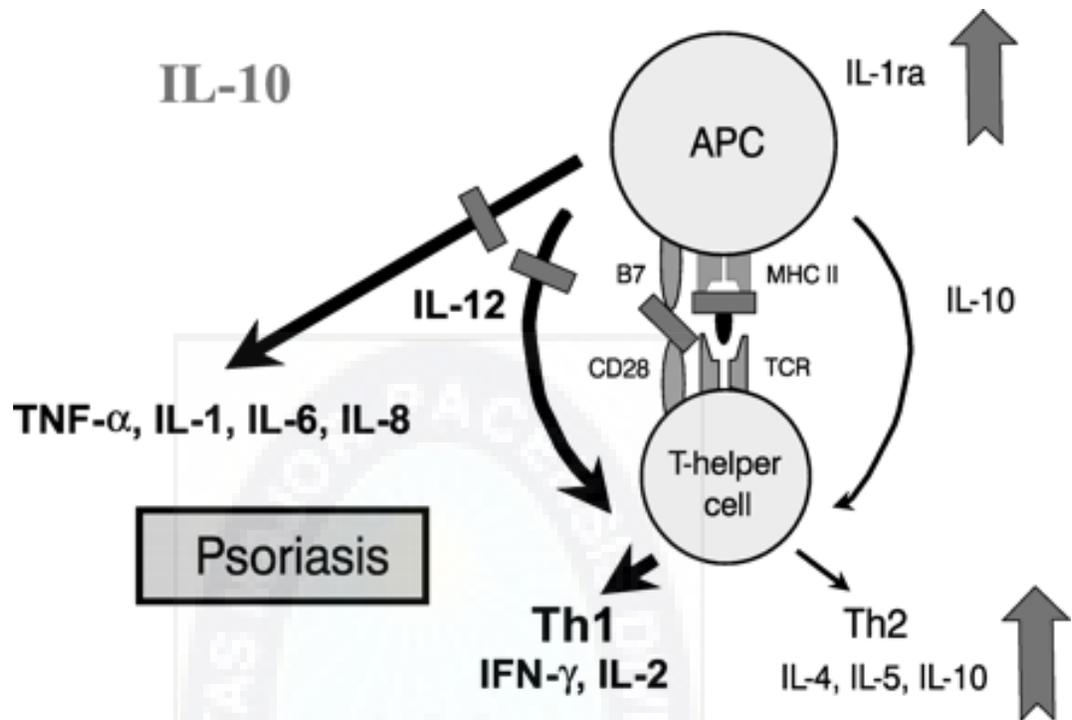


Figura 14. Efectos de IL-10 en el balance Th1/TH2 (18)

II.4.2.6. Factor de crecimiento transformante beta 1

El factor de crecimiento transformante beta 1, TGF-β1 ó TGFB1 es una [proteína](#) perteneciente a la superfamilia de [factores de crecimiento transformante beta](#) de las [citoquinas](#). Es una proteína de secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del [crecimiento celular](#), proliferación celular, procesos de [diferenciación](#) y [apoptosis](#). TGFB1 es una proteína multifuncional implicada, como ya se ha dicho, en el control de la proliferación y la diferenciación, así como en otras funciones de diversos tipos celulares. Esta proteína actúa sinérgicamente con [TGF-alfa](#) en la inducción de la tumorigénesis. También actúa como un [factor de crecimiento autocrino](#) negativo. La desregulación de la activación y de la ruta de señalización del TGFB1 puede desencadenar apoptosis. Muchas células sintetizan TGFB y casi todas ellas tienen [receptores](#) específicos para reconocerlo. Tanto TGFB1, como [TGFB2](#) y [TGFB3](#) actúan a través de los mismos sistemas receptores de señalización. TGFB1 fue el primer miembro de la

familia en ser descubierto en [plaquetas](#) humanas, con un posible papel en el proceso de [cicatrización](#). Posteriormente, fue caracterizado como un precursor proteico de gran tamaño que era procesado por [proteólisis](#) para producir un péptido maduro de 112 aminoácidos. TGFB1 juega un importante papel en el control del [sistema inmune](#) y muestra diferentes actividades en diferentes tipos de células, o en diferentes estadios de desarrollo de la célula. La mayoría de las células inmunes (o [leucocitos](#)) secretan TGFB1.(19)

Algunos tipos de [células T](#), como los [linfocitos T reguladores](#), liberan TGFB1 para inhibir la acción de otras células T. La proliferación dependiente de [IL-1](#) e [IL-2](#) de células T activadas, y la activación de [linfocitos T CD4+](#) y [linfocitos T CD8+](#) quiescentes es impedida por la actividad de TGFB1. De igual modo, el TGFB1 puede inhibir la secreción y la actividad de otras muchas [citoquinas](#), como el [interferón gamma](#), el [factor de necrosis tumoral](#) alfa (TNF α) y varias [interleuquinas](#). También puede disminuir los niveles de expresión de receptores de citoquinas, tales como el [receptor de IL-2](#), para suprimir la actividad de las células inmunes. Sin embargo, el TGFB1 también puede incrementar la expresión de ciertas citoquinas en las células T y promover su proliferación, especialmente si las células son inmaduras. (19)

El TGFB1 tiene un efecto similar en las [células B](#), que también puede variar de acuerdo al estado de diferenciación de la célula donde actúe. Esencialmente, inhibe la proliferación y la apoptosis de linfocitos B, y juega un papel crucial en el control de la expresión de [anticuerpos](#), [transferrina](#) y proteínas [MHC clase II](#) tanto en células B inmaduras como maduras. (19)

II.4.3. Respuesta inmune frente a parásitos.

La mayoría de los parásitos poseen un ciclo de vida muy complejo, parte del cual lo cumplen dentro de los humanos (u otros vertebrados) y otra etapa dentro de intermediarios que los acogen. Los humanos son infectados a menudo por

picaduras o mordeduras de estos organismos intermediarios, como también por compartir el hábitat donde viven. Una característica de las infecciones parasitarias es que suelen ser crónicas, son muchas las razones de esto, incluyendo la inmunidad natural débil y la habilidad de los parásitos para evadir o resistir la eliminación por respuestas inmunes específicas. (10)

La permanencia de parásitos en el organismo conduce a reacciones inmune crónicas, dando como resultado a veces un daño por hipersensibilidad, es decir, por la propia respuesta inmune, más que por la infección misma.(10)

La presencia del parásito en el organismo del hospedero constituye un estímulo antigénico poderoso que ocasiona variadas respuestas por parte del individuo infectado. (10)

Algunas de estas respuestas son letales para el parásito, otras son deletéreas para el hospedero y aún más, otras son aparentemente indiferentes para uno u otro, pero constituyen una indicación de la presencia del parásito, que es a menudo utilizada con fines de diagnóstico.

A menudo el hospedero no evita la invasión por ciertos parásitos, sin embargo puede desarrollar mecanismos de resistencia natural y adquirida, que se oponen a la proliferación y/o permanencia del agente infeccioso.(10)

II.4.3.1. Resistencia natural.

Este tipo de resistencia explica la especificidad parasitaria: esto es, que los parásitos infectan solo algunas especies de hospederos y no a otras. Estos organismos a menudo requieren “señales fisiológicas” provenientes del hospedero para guiar su desarrollo ontogénico (eclosión de los huevos, muda de cutícula, migraciones, etc.). Si ellos invaden una especie de hospedero que no posee las

señales adecuadas, la invasión fracasa (no susceptibilidad) o el parásito no completa su desarrollo. (10)

II.4.3.2. Resistencia adquirida.

La resistencia adquirida está mediada por las reacciones inmunológicas contra el parásito. Sólo tendrán un carácter protector aquellas reacciones que puedan, ya sea destruir al parásito (ejemplo, la fagocitosis o activación del complemento), alterar su fisiología (neutralización de enzimas por anticuerpos o la inhibición de la reproducción celular por citoquinas), o causar cambios drásticos de su hábitat tisular, como ocurre en las respuestas alérgicas. (10)

II.4.4. Respuesta inmune frente a Leishmania.

En la Leishmaniasis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de las células hospederas y se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la curación, en tanto que las citocinas que desactivan al macrófago se correlacionan con la afección. Tal vez por esa razón se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenia.(20)

La respuesta principal a la leishmaniasis es de tipo celular. El progreso de la infección, demostrado en el modelo *Leishmania*-ratón, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4+ hacia las vías Th1 (protección) o Th2 (exacerbación), mencionado anteriormente. La IL-12 induce la expansión de clones Th1, con la elaboración de diferentes perfiles de citocinas, como IFN- γ y TNF- α , que inducen la producción de óxido nítrico (NO) en el macrófago, IL-4 e IL-10 determinan la diferenciación hacia clones Th2 (y activación policlonal de células B), y la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y TGF- β .(20)

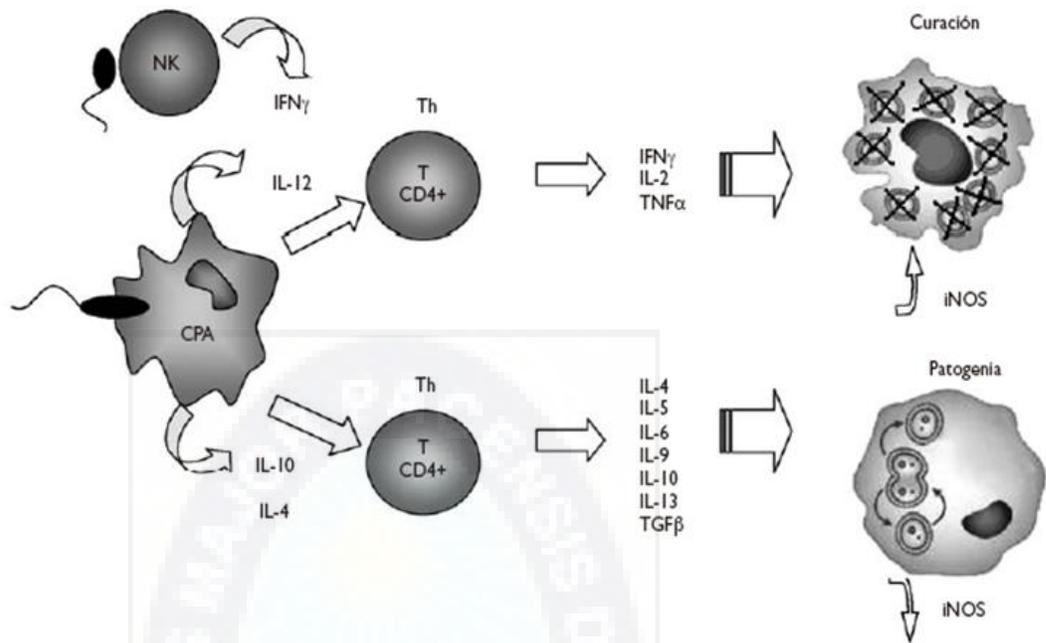


Figura 15. Reacción inmunitaria a leishmania. El modelo murino de la infección señala que la susceptibilidad y resistencia al patógeno dependen del patrón de citocinas expresado por los linfocitos T (20)

El traumatismo secundario a la picadura del vector induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que supone la migración de diferentes células, en especial macrófagos y linfocitos, hacia el sitio de la lesión con el fin de reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización. Por lo general, la infección por *Leishmania* induce una respuesta inmunitaria muy compleja que varía de acuerdo con los diferentes factores. Según sea la especie de *Leishmania* que interviene en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y su cronicidad, se observa un espectro de respuestas inmunitarias, desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica a través de células y anticuerpos. La respuesta de las células T se ha evidenciado a través de reacciones de hipersensibilidad tardía y proliferación de Linfocitos in vitro, en presencia de antígenos de *Leishmania*. (20)

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado y según sean el tipo de célula presentadora de

antígeno (CPA), los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, las células TCD4+ y TCD8+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes. Las citocinas de tipo Th1 como INF γ y TNF α , participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con los isotipos IgG1 e IgG3 en seres humanos (IgG2 en ratones), mientras que las citocinas de tipo Th2, como IL4, IL5, IL6 e IL13, regulan la producción de IgE por los Linfocitos B, que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata.(20)

En términos generales, se ha identificado una intensa reacción mediada por células T para la forma LCL y ausencia de ella en la forma LCD, aunque ambos padecimientos desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la infección y se mantiene durante el curso del trastorno y desaparece solo después de la eliminación de la mayoría de los parásitos. (20)

Por otro lado, en la LMC, se ha descrito el patrón de citocinas como una mezcla de los tipos Th1 y Th2 con buenos niveles sérico de IL2, IFN γ , TNF α e IL5. Se ha señalado que el padecimiento se presenta en realidad por una sobre-activación de la respuesta inmune ya que presenta bajos niveles de IL10 y que la curación dependerá en su mayoría de la relación entre las citocinas producidas y menos de la presencia o ausencia de citocinas en particular.(20)

Está bien documentado que la Th1 en la respuesta inmune es el evento clave para prevenir la infección por Leishmania. La activación de células Th1 inducen a IFN- γ que activa a los macrófagos que destruyen a los parásitos. (20)

Los ratones C57BL/6 montan la respuesta inmune Th1 y así evitar el crecimiento del parásito y causan su autosanación; mientras que la susceptible cepa BALB / c monta una pronta respuesta Th2 y los resultados en la lesión son de no curación y la exageración de la enfermedad. Respectivamente la resistencia y la susceptibilidad de cepas de ratones C57BL / y BALB / c dependerá no sólo

del tipo de respuesta inmune Th1 y Th2, de células T CD4+, sino también de la genética del huésped. (21)

La respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* inicia con la respuesta innata. Los receptores TLR2 (Toll-like receptor 2), presentes en macrófagos, células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK) reconocen moléculas en la superficie del parásito, tales como el lipofosfoglicano (LPG) y una glicoproteína de 63kDa (gp36) e inducen la producción de citocinas proinflamatorias: TNF- α , IFN- γ e IL-12, así como de moléculas coestimuladoras. (20)

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

El macrófago cubre un papel triple en la enfermedad: es la célula hospedera, célula presentadora de antígenos que activan las células T específicas y célula efectora cuya eficacia leishmanicida depende de la activación por parte de las citocinas IFN- γ y TNF- α .(20)

En el ambiente ácido del fagolisosoma, el amastigote sobrevive gracias a la gp63, cuya actividad proteolítica a pH ácido le permite degradar enzimas lisosomales. El LPG protege al parásito del estallido respiratorio mediante el secuestro de aniones superóxido y radicales hidroxilo, la inhibición de una actividad eficaz de la proteína cinasa-C, relevante en el estallido respiratorio.(20)

II.5. Tratamiento.

Hasta la fecha, en Bolivia se ha estado empleando antimoniales pentavalentes a dosis de 20 mg x kg x día durante 20 días continuos para LC y 30 días para LV y LMC, esto recomendado por la OMS en 1990. Para pacientes con fracaso terapéutico, o con lesiones secundarias mucosas, se opta por la Anfotericina B (Fungizone), este tratamiento debe realizarse en ambiente

hospitalario ya que este es evidentemente tóxico.(4) Por lo que se está tratando de implementar un tratamiento alternativo con el extracto de Evanta.

II.5.1. Glucantime.

Solución inyectable para el tratamiento de la leishmaniasis, kala-azar, enfermedad de Nicolás Favré. (22)

II.5.1.1. Farmacodinamia y Farmacocinética en humanos.

El mecanismo de acción de los antimoniales orgánicos, se desconoce, aunque se sabe que reaccionan fácilmente con los grupos sulfhidrilo. La droga es selectivamente incorporada mediante un proceso de endocitosis y llega a los fagolisosomas de los macrófagos en donde se encuentran alojados los parásitos.(22)

Absorción, distribución y excreción: Los antimoniales pentavalentes no son fijados por los eritrocitos y alcanzan concentraciones mucho mayores en el plasma que los compuestos trivalentes. En consecuencia, los compuestos pentavalentes son excretados más rápidamente por los riñones. Después de una inyección intramuscular, más de 80% de la dosis administrada de antimoniales pentavalentes aparece en la orina en el curso de 6 horas. Después de una inyección intravenosa, la excreción urinaria comparable es superior a 95%, lo que indica que la droga no es metabolizada en forma apreciable. 12% se acumula en un compartimento extravascular, el cual adquiere saturación después de 5 días de tratamiento y desde donde el antimonio es lentamente liberado.(22)

II.5.1.2.Reacciones secundarias y adversas.

Al inicio del tratamiento se pueden presentar: reacciones febriles transitorias acompañadas de escalofríos o sensación de debilidad con sudación, tos y vómito

asociados al antimonio. Han sido reportadas raramente: cefalea, malestar general, disnea, rash cutáneo, edema facial, dolor abdominal, modificaciones de las pruebas de función hepática y renal.(22)

Se han observado muy raramente casos de pancreatitis.

Cambios en los trazos electrocardiográficos son dependientes de la dosis y generalmente reversibles, en la mayoría de los casos, inversión de la onda T y prolongación del intervalo QT precede el hecho de arritmias severas.

Incremento de las enzimas hepáticas, leucopenia leve, cambios electrocardiográficos.(22)

II.5.1.3.Dosis y vía de administración.

Se debe administrar 60 a 70 mg/kg/día por vía intramuscular, es decir alrededor de 20 mg/kg/día de antimonio.

El comienzo del tratamiento debe hacerse a dosis progresivamente crecientes. La dosis máxima diaria generalmente admitida es de 3 g/día, es decir dos ampollitas de 5 ml.

El tratamiento comprende por lo general una serie de 12 a 15 inyecciones seguida, después de un periodo de reposo de 15 días (22).

II.5.2. Anfotericina.

La anfotericina B es un antibiótico antifúngico de uso parenteral y oral obtenido por fermentación del *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto del suelo. La anfotericina B está químicamente emparentada con la nistatina, siendo un antibiótico poliénico. La denominación se este antibiótico se debe a sus propiedades anfóteras, debido a la presencia un grupo ácido y de un grupo amino, lo que permite que el producto sea relativamente soluble en agua. (23)

II.5.2.1. Farmacodinamia y Farmacocinética en humanos.

La anfotericina B se une a los esteroides de las membranas celulares tanto de los hongos como humanas, deteriorando la integridad de las mismas, esto se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares. La mayor afinidad de la anfotericina B hacia el ergosterol, un esteroide encontrado en las membranas de los hongos es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, como el fármaco se une también al colesterol (esteroide preferente de las membranas de las células humanas) la anfotericina B presenta algunos efectos tóxicos, en particular a nivel renal. (23)

In vitro, la anfotericina B es activa contra muchos hongos patógenos, incluyendo *Acremonium sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium sp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucor mucedo*, *Rhodotorula spp.* y *Sporothrix schenckii*.(23)

En un estudio in vitro se observó sinergismo frente a *Fusarium* de la combinación anfotericina B y azitromicina, igualmente la combinación de anfotericina B y rifabutina ha mostrado ser sinérgica frente *Fusarium* y *Aspergillus*. Algunos protozoos que son sensibles son *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana*, y *Naegleria fowleri*. Ocasionalmente, la *Acanthamoeba castellanii* y *A. polyphaga* son susceptibles a la anfotericina B. La mayoría de las cepas son inhibidas por la anfotericina B a concentraciones de 0,03-1,00 g/ml. La anfotericina B tiene una baja o nula actividad contra bacterias y virus. (23)

II.5.2.2. Dosis y vía de administración.

- Adultos: dosis iniciales de 0.25-0.5 mg/kg i.v. una vez al día con aumentos graduales hasta 0.5-1 mg/kg/día. Después, administrar en días alternos.
- Niños: Inicialmente 0.25 mg/kg/día i.v. en dextrosa al 5% en 2 a 6 horas. Aumentar gradualmente las dosis hasta 0.125 a 0.25 mg/kg diarias o cada 2 días hasta un máximo de de 1 mg/kg/día o 30 mg/m²/día. (23)

Administración parenteral: con objeto de reducir al máximo los efectos adversos, la anfotericina se administra por infusión intravenosa a lo largo de 4 a 6 horas. Infusiones de 45 minutos han ocasionado graves hiperkalemias y fibrilación ventricular en un paciente anúrico con una dosis relativamente elevada. Si la infusión dura más de 2 horas, hay que agitar la suspensión; debe evitarse una infusión intravenosa "rápida" (< 1 hora) ya que pueden aparecer efectos adversos graves. Para la infusión, diluir el producto reconstituído con 500 ml de dextrosa al 5%. El pH debe ser superior a 4.2. La máxima concentración recomendada es de 0.1 mg/ml.(23)

II.5.2.3. Reacciones adversas.

Reacciones debidas a la infusión: Las reacciones clínicas adversas más comunes son: escalofríos, fiebre, náuseas y vómitos, las cuales aparecen durante los dos primeros días de tratamiento. Las reacciones adversas relacionadas con la administración de anfotericina B han sido generalmente leves o moderadas y se han manifestado principalmente durante los dos primeros días de tratamiento. (23)

La anfotericina B ha mostrado estimular la síntesis de la prostaglandinas lo que puede explicar las reaciones observada durante la infusión y el hecho de que la hidrocortisona, la meperidina o el ibuprofen supriman algunos de estos síntomas. El dantolen ha mostrado ocasionalmente antagonizar los efectos adversos de la infusión, que son más severos en pacientes que han recibido transfusiones recientes. (23)

X. Antecedentes.

La leishmaniasis es una zoonosis parasitaria multifacética secundaria a la infección por un protozoo del género *Leishmania* que puede afectar a los seres humanos y otras especies de mamíferos. La Organización Mundial de la Salud la considera la cuarta enfermedad más importante en el trópico. (24)

Aunque se han realizado progresos en el diagnóstico y se ha desarrollado una variedad de inmunoterapias y quimioterapias para el tratamiento de esta enfermedad, en los últimos años se ha observado un incremento de la incidencia de leishmaniasis en América Latina. Al parecer, el contraste de los cuadros clínicos radica en diferencias de la respuesta inmunitaria precipitada en el hospedero.(24)

Por lo general, la infección por *Leishmania* induce una reacción inmunitaria muy compleja que varía de acuerdo con los diferentes factores. Según sea la especie de *Leishmania* que interviene en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y su cronicidad, se observa un espectro de respuestas inmunitarias, desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica a través de células y anticuerpos. La respuesta de las células T se ha evidenciado a través de reacciones de hipersensibilidad tardía y proliferación de linfocitos *in vitro* en presencia de antígenos de *Leishmania*. (24)

En esta enfermedad, la eliminación del parásito parece depender de la activación de la célula hospedera y se ha observado que la producción de citoquinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la curación, en tanto que las citoquinas que desactivan al macrófago se correlacionan con la afección. Por esta razón se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenia.(20)

Se ha estudiado también que la infección de *L. major* o *L. mexicana* de ratones resistentes conduce a la inducción preferencial de linfocitos tipo Th1 que secretan IL2, INF- γ y TNF- α , las cuales activan a los macrófagos a la eliminación intracelular de los parásitos, vía síntesis de óxido nítrico. En contraste, la infección en ratones susceptibles con esos mismos parásitos, conduce a la activación de linfocitos Th2 productores de IL-4 e IL-10 que regulan en forma negativa la activación de macrófagos. (24)

La regulación de la respuesta inmune dirigida contra el parásito de *Leishmania* es crítica por el establecimiento de un control efectivo contra la enfermedad. Para una mejor comprensión del posible papel que las subpoblaciones de células T, y sus citoquinas asociadas tienen en la progresión de la enfermedad y / o respuesta inmunitaria contra la infección por *L. braziliensis*, se realizó el estudio "Correlaciones antígeno-específico de la respuesta inmune celular en la leishmaniasis humana sugiere mecanismos de inmunorregulación" donde detallan de la frecuencia de las células T activadas y de memoria, y la producción de citoquinas por estas mismas células.(25) Después de la determinación de la producción de citoquinas por esta población celular en respuesta al antígeno total de *Leishmania*, se realizó un análisis de correlación entre la producción de citoquinas de las poblaciones celulares, para identificar los mecanismos celulares de inmunorregulación en la leishmaniasis cutánea. Donde demostraron una correlación positiva entre la producción de citoquinas específicas (IFN-gamma o IL-10) por las células productoras CD45RO, una correlación negativa entre la frecuencia de IFN-gamma producidas por las células CD69 y, demostraron que IL-10 induce la regulación negativa de la actividad de los monocitos. (25) También se tiene claro que TGF- β es otra citocina importante en la modulación de la respuesta inmune en leishmaniasis experimental (26). Por una parte se ha señalado que la producción de TGF- β es inducida por el parásito y constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica del hospedador al suprimir a los linfocitos T CD4+ Th1 (26).

La identificación del valor curativo de las plantas proviene generalmente de la información proporcionada por los propios originarios de los pueblos, por lo que se realizaron investigaciones e identificación de los principios activos para el desarrollo de nuevas drogas (27), el Laboratorio de Farmacognosia - Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) , desarrolla, desde hace 20 años, investigaciones científicas de las cualidades curativas de la planta medicinal Evanta. La investigación se concentra en el programa de sustancias naturales antiparasitarias, enfocado principalmente en la leishmaniasis, la malaria y el mal de Chagas. Siendo el estudio de las cualidades curativas de la evanta para la leishmaniasis, el más adelantado y en su fase final de validación científica y posterior registro.(28)

Los chimanes y otros grupos étnicos emplean la corteza del tronco fresca de la evanta para sus curaciones, originalmente estos grupos étnicos, recolectaban el polvo de la corteza del árbol para convertirla en un emplasto y el que se aplicaban sobre la lesión, mínimamente por media hora. La renovación de esta práctica y aplicación de la evanta, varias veces al día, cicatriza la lesión.(28)

Entre los años 1985-1991, en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA) dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), un grupo de investigadores Franco-Boliviano estudiaron la actividad antiparasitaria de los extractos de la *Galipea longiflora* (Evanta), hojas, raíces y corteza, aislándose e identificando 15 alcaloides quinoléicos(29,30,31). Algunos de estos alcaloides presentes en hojas resultaron eficaces y con baja toxicidad in vivo, por lo que fueron patentados (Chimaninas A, B, C y D US4209519/15/04/93)(32,33,34).

En 1993 el IIFB (Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas), de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (UMSA) empezaron sus estudios en plantas de medicina tradicional, con el financiamiento de FONAMA-EIA, ahora trabajan en la evaluación biológica de las plantas medicinales contra

las parasitosis de malaria (*Plasmodium falciparum*), Leishmania (*Leishmania spp*) y Chagas (*Trypanosoma cruzi*), como una herramienta en la validación de las farmacopeas tradicionales en proyectos multidisciplinarios. En el IIFB, además de reproducir estudios químico-biodireccionados en modelos de Leishmania, *in vitro*, obtuvieron información tóxico- cinética, aguda y crónica, en modelos roedores, usando extracto crudo, alcaloides totales puros obtenidos de la corteza del árbol de Evanta (35,36,37), también valoraron bajo métodos colorimétricos cuantitativamente la actividad Leishmanicida de Galipea Longiflora (Evanta) frente a una droga control (Anfotericina B) (38), donde evidenciaron que existe una actividad leishmanicida de EAE frente a todas las cepas de Leishmania ensayadas, reportadas por Fournet et.al.(34,29) a través de métodos ópticos.

Estudios acerca de nuevas terapias basadas en productos naturales realizados en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA, en el Instituto SELADIS, departamento de Inmunología nos demuestra que el extracto de alcaloides de Galipea Longiflora (Evanta) afecta tanto a la proliferación celular como a la producción de citoquinas pro – inflamatorias como son el factor de necrosis tumoral e interferón gamma *in vitro*, por lo que hasta el momento estos resultados sugieren que este extracto de alcaloides de Evanta, podría tener efecto inmunomodulador (39). En el mencionado estudio se planteó la hipótesis de que la curación observada al utilizar esta planta, no sólo se debía a la acción directa sobre el parásito, si no que posiblemente existía un efecto paralelo en la respuesta inmune del huésped en el proceso de curación, donde demostraron que Evanta tiene un efecto leishmanicida directo, así como interferencia en la activación tanto de células murinas y células T humanas ya que observaron una reducción de la proliferación celular *in vitro* y la producción de INF γ , que podrían contribuir al control de la reacción inflamatoria crónica que caracteriza a la infección por Leishmania (40).

XI. Justificación.

Entre los años 1983 a 2006, se observa que la tendencia de la Leishmaniasis está en aumento.(4) El incremento de casos que se observa, tiene a la par, la expansión geográfica, que puede deberse a la colonización de nuevas áreas geográficas. A partir de 1990 los casos notificados pasan del millar de personas, el 2004, 2800 personas; se debe tomar en cuenta la existencia de sub registro de casos. (4)

De acuerdo a la bibliografía revisada, en el departamento de La Paz es donde se registra aproximadamente la mitad de casos reportados a nivel nacional. (4)

La respuesta inmune en el caso de la leishmaniasis parece ser fundamental en el desarrollo de la infección, en especial claramente definida en modelo murino. En cuanto a la respuesta inmunitaria en humanos con Leishmaniasis, está siendo estudiada desde hace varios años, ya que no está totalmente clara. Se estudió la cuantificación de los linfocitos T totales (CD3) y las subpoblaciones linfocitarias (CD4 y CD8, donde se observó una disminución significativa de los niveles de linfocitos CD3 y CD4 en los enfermos con Leishmaniasis cutánea, no así de los niveles de CD8, en relación con los controles normales (44); evaluaron también la respuesta inmunológica en pacientes con leishmaniasis mucocutánea, donde observaron que estos pacientes respondieron débilmente al test de proliferación linfocitaria en presencia de antígeno de *Leishmania braziliensis*,(44) Dentro de los efectos de la activación de la respuesta inmune esta la proliferación celular, la producción de citoquinas activación celular(de macrófagos por ejemplo) y otras.

De esta manera decimos que la respuesta inmunológica que desarrollan los pacientes con Leishmaniasis cutánea, puede ser evaluada tanto en términos de proliferación celular como en producción de citoquinas específicas, ya que constituyen una importante aproximación en la determinación de los mecanismos inmunológicos involucrados en esta enfermedad, es por esto que pretendemos

establecer en primera instancia las características inmunológicas relacionadas a la capacidad de respuesta proliferativa, así como la producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea; este trabajo puede coadyuvar en un futuro, siendo una referencia bibliográfica para posteriores investigaciones respecto al control de la respuesta inmune de pacientes con esta enfermedad. Al margen, se pretende, también, evaluar el efecto de la administración de EAE en pacientes, tratados oral y tópicamente.



XII. Planteamiento del problema.

En la Leishmaniasis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de las células hospederas. Se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la curación, en tanto que las citocinas que desactivan al macrófago se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad. Tal vez por esa razón se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenia.(20)

La respuesta principal a la leishmaniasis es de tipo celular. El progreso de la infección, demostrado en el modelo *Leishmania*-ratón, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4+ hacia las vías Th1 (protección) o Th2 (exacerbación). La IL-12 induce la expansión de clones Th1, con la elaboración de diferentes perfiles de citocinas, como IFN- γ y TNF- α , que inducen la producción de óxido nítrico (NO) en el macrófago, IL-4 e IL-10 determinan la diferenciación hacia clones Th2 (y activación policlonal de células B), y la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y TGF- β .(20)

Aún se debe evaluar la respuesta inmunitaria de los pacientes que están siendo tratados con el extracto de alcaloides totales de Evanta. La medicina tradicional y los estudios científicos han demostrado que el extracto crudo de Evanta [*Galipea longiflora*, *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki] presenta una actividad Leishmanicida. De acuerdo a Calla et al., se planteó la hipótesis de que la curación observada al utilizar esta planta, no sólo se debía a la acción directa sobre el parásito, si no que posiblemente existía un efecto paralelo en la respuesta inmune del huésped en el proceso de curación. Demostraron que Evanta tiene un efecto leishmanicida directo, así como su interferencia en la activación tanto de células murinas como células T humanas ya que se observó una reducción de la proliferación celular *in vitro* y la producción de IFN γ , que podrían contribuir al control de la reacción inflamatoria crónica que caracteriza a la

infección por Leishmania (40), pero como ellos mismos lo mencionan, los estudios *in vivo* son necesarios para corroborar este hallazgo.

XIII. Pregunta de Investigación.

¿Cuál será el espectro de la respuesta proliferativa y de producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con leishmaniasis cutánea durante la gestión 2010?

XIV. Diseño de Estudio.

VII. 1. Descripción.

Estudio experimental piloto.

VII.2. Tipo de Diseño.

Experimental, comparativo.

VIII. Objetivos.

VIII.1. Objetivo General.

Evaluar la respuesta proliferativa y producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis Cutánea durante la gestión 2010.

VIII.2. Objetivos Específicos.

- Establecer las diferencias en la respuesta proliferativa de linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis activa, sin tratamiento, con tratamiento y grupo control.

- Cuantificar la producción de Interferón Gamma (γ), Interleuquina 10 (IL-10) y Factor Transformante de crecimiento β (TGF - β) de Linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea y grupo control mediante la técnica de ELISA.

- Verificar de forma preliminar el efecto de la administración de Evanta tópicamente como tratamiento en pacientes con Leishmaniasis cutánea, en la proliferación y producción de citoquinas de Linfocitos provenientes de estos pacientes.

IX. Aspectos Éticos.

Al ser parte del proyecto “Enfermedades Infecciosas” que ha sido aprobado en todas las instancias y cuenta con el aval del Comité Nacional de Bioética y el Consentimiento Informado correspondiente.

Proyecto aprobado, en este sentido los pacientes involucrados tienen conocimiento y consentimiento acerca de todo el procedimiento a realizarse en ellos. (ver Anexo1)

X. Materiales y Métodos.

X.1. Materiales.

Placas de cultivo de 96 pozos, estériles (Becton Dickinson). Tubos Falcon estériles de 15 mL. (Becton Dickinson). Tubos Falcon estériles de 50 mL. (Becton Dickinson). Pipetas pasteur de vidrio 9` autoclavadas (VWR internacional). Filtros millipore 22 um. (MILLIPORE). Pipetas de plástico estériles de 5 mL. (greiner bio-one). Pipetas de plástico estériles de 10 mL. (greiner bio-one). Jeringas de 20 mL. Propipeta automática (Drummond). Placas de ELISA de 96 pozos (Becton Dickinson).

X.2. Reactivos.

Medio de cultivo RPMI (suplementado) (SIGMA- ALDRICH). Medio de cultivo RPMI (suplementado) sin rojo fenol. (GIBCO). Suero Fetal bobino (GIBCO). Ficoll Hipaque densidad 1.077 (ver anexo). PBS celular filtrado (ver anexo). PBS Tween (ver anexo).Azul tripán 0.2% (SIGMA). Dextrán filtrado (INTI). Concanavalina A (SIGMA). Kit MTT (invitrogen). Kit Interferón Gamma (γ) humano (Becton Dickinson). Kit Human IL-10 humano (Becton Dickinson). Kit Human TGF- β 1 humano (Becton Dickinson).

X.3. Equipos.

Campana de Flujo laminar (NUAIRE CLASS II). Centrífuga (eppendorf). Microscopio (OLYMPUS). Microscopio invertido (OLYMPUS). Estufa de CO2 (NUAIRE). Lector de ELISA (AWARENESS TECHNOLOGY INC)

X.4. Procedimientos.

X.4.1.- Obtención de Antígeno de Leishmania.

Parásitos. Promastigotes de *Leishmania braziliensis* (WHO 2305) fueron mantenidos a 37°C en medio de cultivo M199 conteniendo 10 % de SFB, 50 ug/ml of penicilina / streptomycin, suplementado con Adenina (10 nM), Hemina (0.25%), biotina (0.1%) y biopterina (0.25 mg/ml). Los promastigotes fueron usados en la fase logarítmica (3 a 4 días de cultivo).

Para la obtención del extracto total del antígeno procedió a congelar y descongelar repetidamente, 10 ciclos en total, una suspensión de parásitos (1×10^6 cel/ml). Como último paso procedió a realizar la sonicación a 20-50 kHz por 30 minutos. Se esterilizó por filtración (millipore 0,22 μ m). Luego se cuantificó el contenido de proteínas por el método del pirogalol.

X.4.2. Cultivo de linfocitos de sangre periférica

X. 4.2.1 Estratificación Celular.

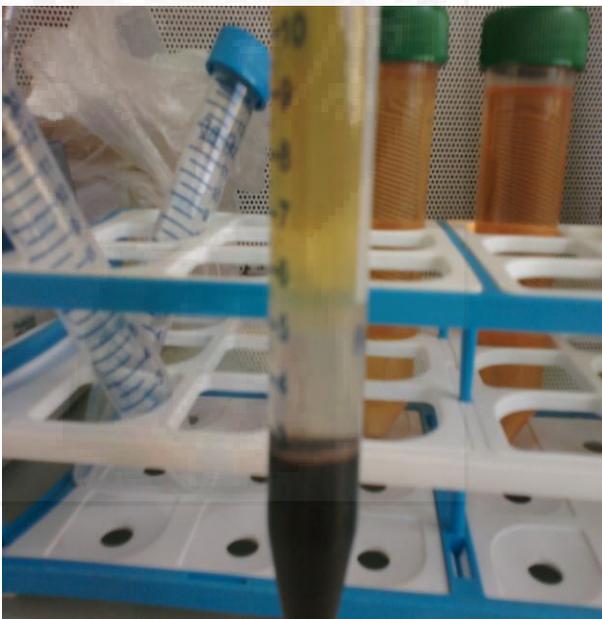
Para realizar el aislamiento de células mononucleares de cada paciente, se obtuvo 20 mL de sangre periférica del paciente, y se agregó inmediatamente heparina a la jeringa, trabajando siempre en condiciones estériles. En la campana de flujo laminar se adicionaron 5 mL de dextrán a los 20 mL de muestra y se incubó 45 minutos a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo, se observó que las células rojas sedimentaron por lo que se obtuvo el plasma sanguíneo rico en leucocitos en un tubo de 50 ml, diluyéndose luego 1:2 con PBS celular.

Se estratificó la muestra diluida con Ficoll Hypaque a una relación de 3 mL de Ficoll Hypaque con 5 mL de muestra.



Se centrifugó por 20 minutos a 1200 rpm. Una vez transcurrido este tiempo se obtuvo el siguiente resultado:



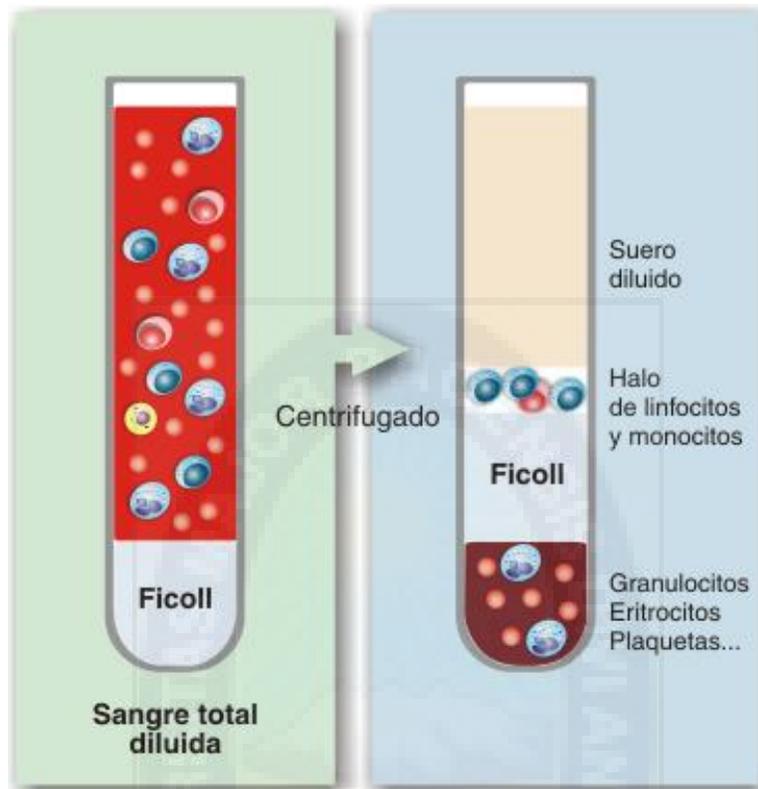


Figura 16. Estratificación celular (44)

Se procedió a separar el halo de células mononucleares, en un tubo falcon de 15mL estéril y se volvió a centrifugar una vez más por espacio de 8 minutos a 1200 rpm; una vez obtenido el pellet, enseguida se realizaron los lavados, para lo cual se utilizó medio de cultivo RPMI (ver anexo 2), se realizaron 3 lavados y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo después del último lavado.

X.4.3. Viabilidad y Ajuste de la densidad celular.

Para medir la viabilidad celular se utilizó azul tripán al 0.2%; se realizó una dilución 1:10 de las células, e inmediatamente se observó al microscopio, para realizar el recuento. (El aislamiento es válido si la viabilidad es mayor al 95%).

Con el recuento celular realizado (en cámara de New Bawer), se calculó la densidad celular, para luego realizar el ajuste.

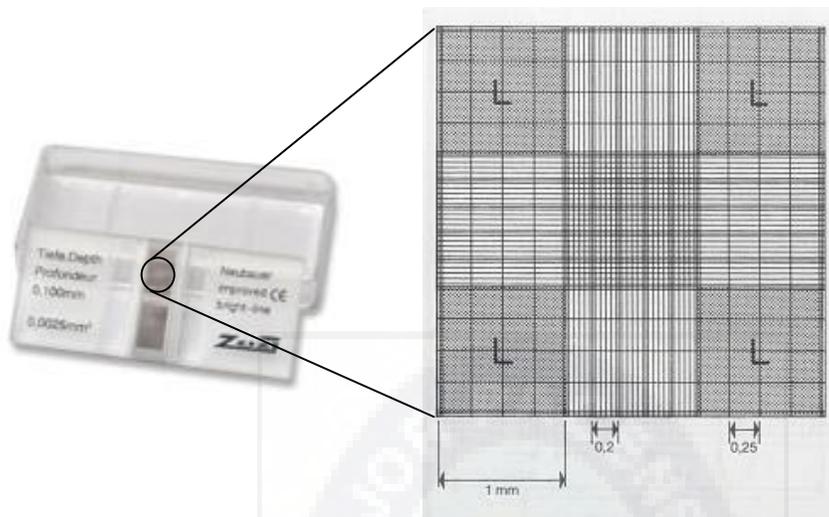
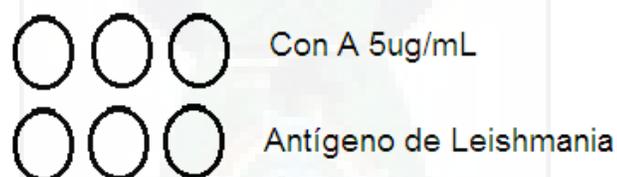


Figura 17. Cámara de New Bawer (44)

Se realizó el ajuste celular a una densidad de 2×10^6 células /mL., (células listas para ser cultivadas).

X.4.4. Cultivo celular.

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



Para este sembrado necesitamos Concanavalina A (Con A) a una concentración de 5ug/mL, en cada pozo, también Extracto de Alcaloides totales de Evanta a una concentración de 50 y 25 ug/mL por pozo y Antígeno filtrado de Leishmania a una concentración de 30 ug/mL.

Se incubaron las células por 48 horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 98% de humedad.

X.4.5. Test de MTT.

La técnica de MTT es un método simple para determinar el número de células vivas utilizando un lector de absorbancias para microplacas estándar, esta técnica se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)) en cristales de azul de formazan por la activación metabólica de las células.

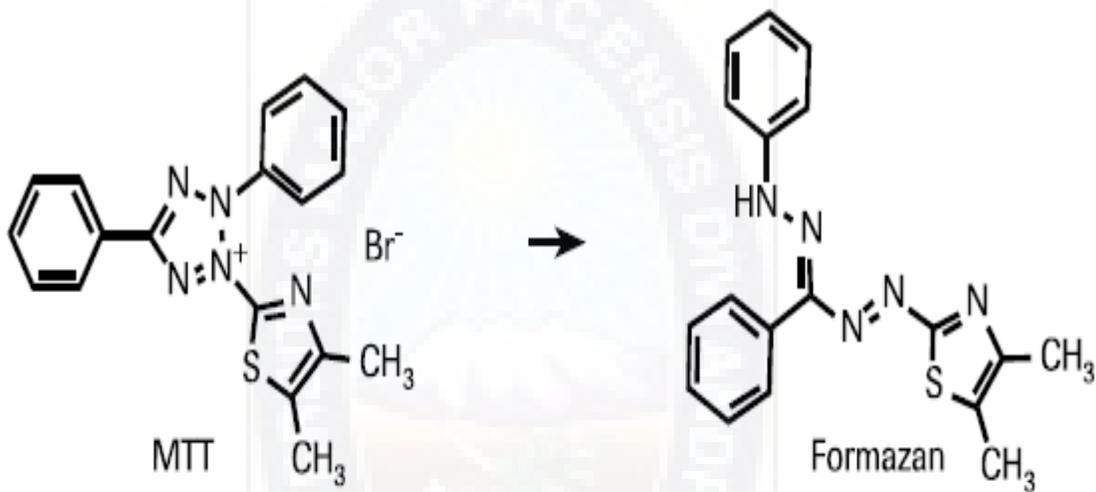


Figura 18. Reacción química de MTT (45)

Se siguieron las instrucciones del fabricante para la preparación de los reactivos (ver anexo 2).

Se procedió a centrifugar la placa de cultivo por 5 minutos a 1500rpm, y cuidadosamente se recuperó el sobrenadante, (el cual se utilizó para medir la producción de citoquinas).

Posteriormente se agregó a cada pozo, 100uL de RPMI estéril sin rojo fenol (ver anexo 2), y 10 uL de reactivo MTT, y se incubó por 4 horas a 37 °C.

Una vez transcurrido este tiempo se agregó 100 uL de SDS (ver anexo 2) para disolver los cristales formados incubándose toda la noche.

Se hizo la lectura de la placa de cultivo en un lector de ELISA a 570 nm de longitud de onda.

X.4.6. Cuantificación de citoquinas producidas mediante la técnica ELISA.

La cuantificación de producción de INF- γ , IL-10 y TGF- β 1, se la realizó por la técnica de ELISA, los tres procedimientos se realizaron de la misma manera y de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, primero se sensibilizó la placa de ELISA de 96 pozos, con 100 uL de Anticuerpo de Captura diluido en Coating Buffer por pozo y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS tween (ver anexo 2) 300uL por pozo, luego se bloquearon las placas con 200 uL deL buffer de bloqueo (ver anexo 2) por pozo, para esto se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS tween para luego añadir las muestras (estas se diluyeron de acuerdo a la necesidad para cada citoquina) se colocaron 100 uL de muestra en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente por dos horas. Al siguiente día se realizaron 5 lavados con PBS tween, y se añadió 100 uL de Conjugado (Anticuerpo de detección más enzima) diluido en el buffer indicado por pozo, y se dejó actuar por una hora a temperatura ambiente, enseguida se procedió a lavar 7 veces más con PBS tween y se agregó a cada pozo 100 uL de sustrato (TMB), y se dejó actuar 15 minutos, una vez transcurrido este tiempo se añadió 50 uL de solución de parada (ácido sulfúrico) y se obtuvieron las lecturas de las absorbancias.

XI. Resultados.

La población en estudio estuvo constituida por 22 pacientes, de los cuales 41% (9) fueron de sexo femenino y 59% (13) masculino. La población en estudio estuvo constituida por tres grupos, 16 pacientes con diagnóstico positivo para Leishmaniasis cutánea sin tratamiento, 3 pacientes con diagnóstico positivo para Leishmaniasis cutánea con tratamiento de Glucantime y 3 con diagnóstico positivo para Leishmaniasis cutánea en tratamiento con Evanta el cual se aplicó tópica y oralmente. El grupo control estuvo constituido por 10 personas aparentemente sanas, de las cuales 60% (6) fueron del sexo femenino y 40% (4) del sexo masculino. La edad media de los pacientes fue de 34 años, y la del grupo control fue de 25 años.

XI. 1. Obtención del Antígeno de Leishmania.

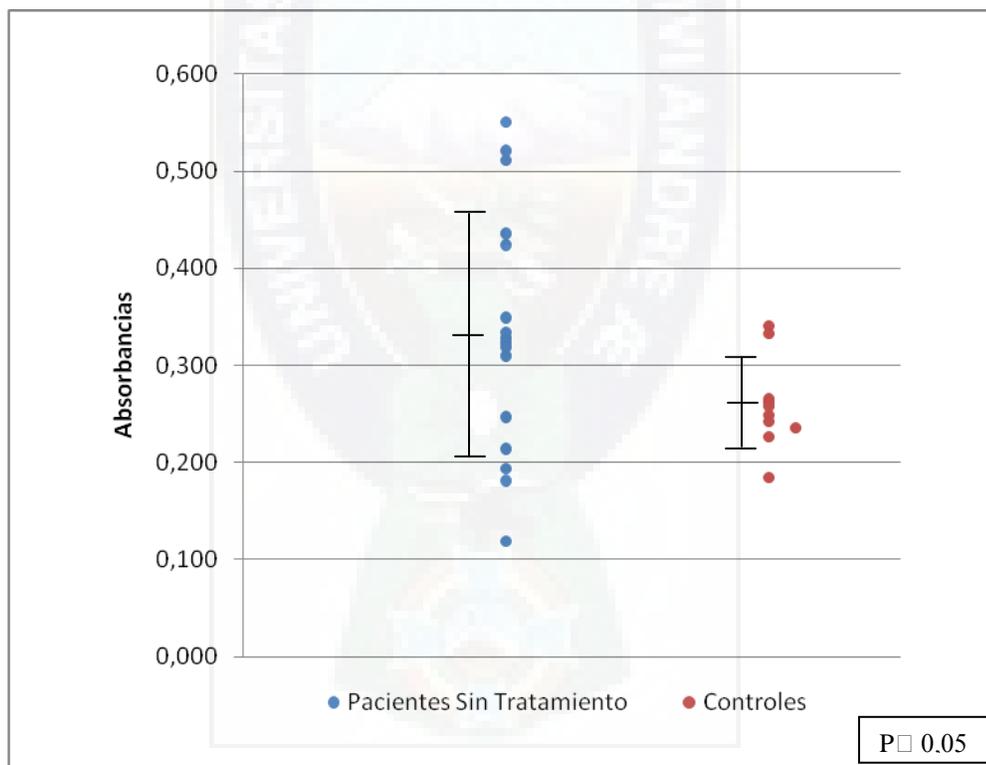
En cuanto a la preparación del Antígeno de Leishmania, se obtuvo una concentración de 1,98 mg/mL de acuerdo a la cuantificación de proteínas por el método de pirogalol.

XI.2. Respuesta proliferativa en pacientes sin tratamiento versus controles.

La determinación de la proliferación celular de los grupos en estudio fue establecida mediante la técnica de MTT el cual es un método simple para determinar el número de células vivas.

XI.2.1. Respuesta proliferativa inducida por antígeno de *Leishmania braziliensis*.

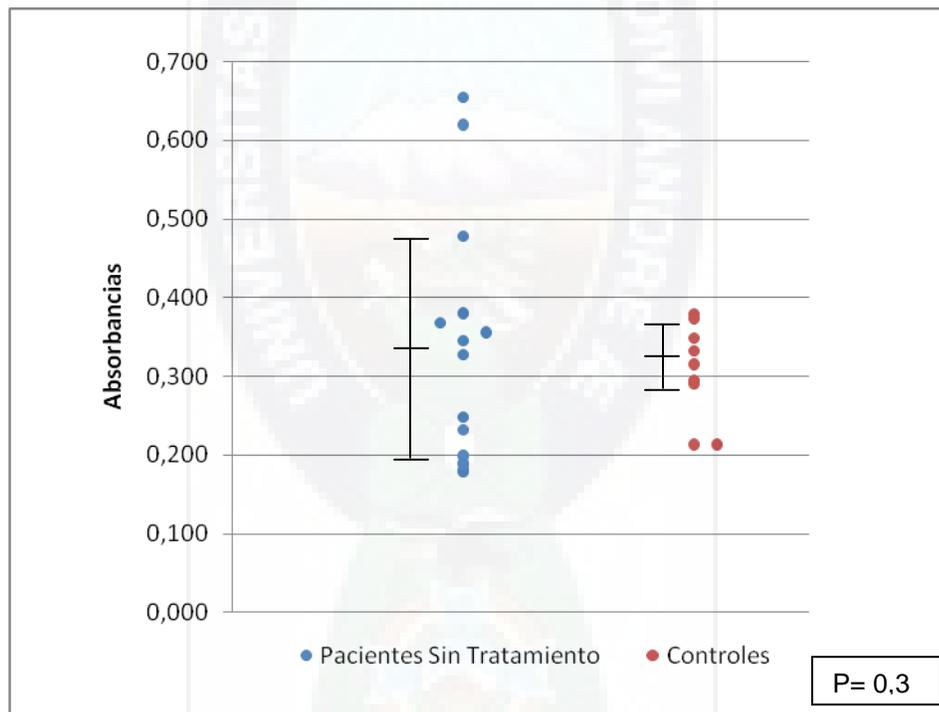
En la Gráfica 1, observamos que en los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una proliferación celular mayor comparada con el grupo control, aunque varios de los pacientes muestran una respuesta proliferativa similar e incluso menor a los controles, lo que nos muestra una marcada dispersión de los resultados. La comparación de las medias del grupo de pacientes en estudio sin tratamiento es de $0,335 (\pm 0,125)$ versus la media del grupo control de $0,260 (\pm 0,0455)$, nos da un resultado significativo ($p \leq 0,05$).



Gráfica 1. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus controles estimulados con antígeno de *Leishmania braziliensis* $0,335 \pm 0,125$ versus $0,260 \pm 0,0455$, $p \leq 0,05$.

XI.2.2. Respuesta proliferativa inducida por Concanavalina A.

En la Gráfica 2, observamos que en los cultivos celulares de 3 pacientes sin tratamiento estimulados con Concanavalina A existe una proliferación celular mayor comparada con el grupo control y en la mayoría de los pacientes la respuesta proliferativa es similar e incluso menor a los del grupo control. La comparación de las medias del grupo de pacientes sin tratamiento es de $0,322 (\pm 0,150)$ versus la media del grupo control de $0,305 (\pm 0,056)$, nos da un resultado no significativo ($p=0,3$).

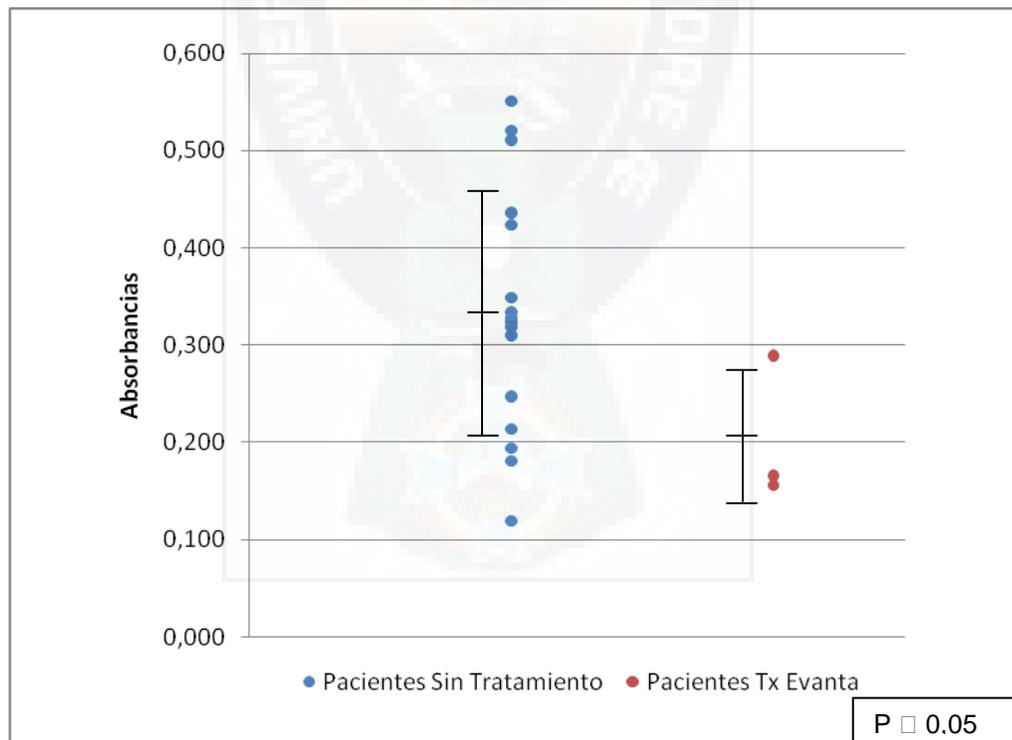


Gráfica 2. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus controles estimulados con Concanavalina A ($0,322 \pm 0,150$ versus $0,305 \pm 0,056$, $p=0,3$).

XI.3. Respuesta proliferativa en pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento.

XI.3.1. Respuesta proliferativa inducida por antígeno de *Leishmania braziliensis*.

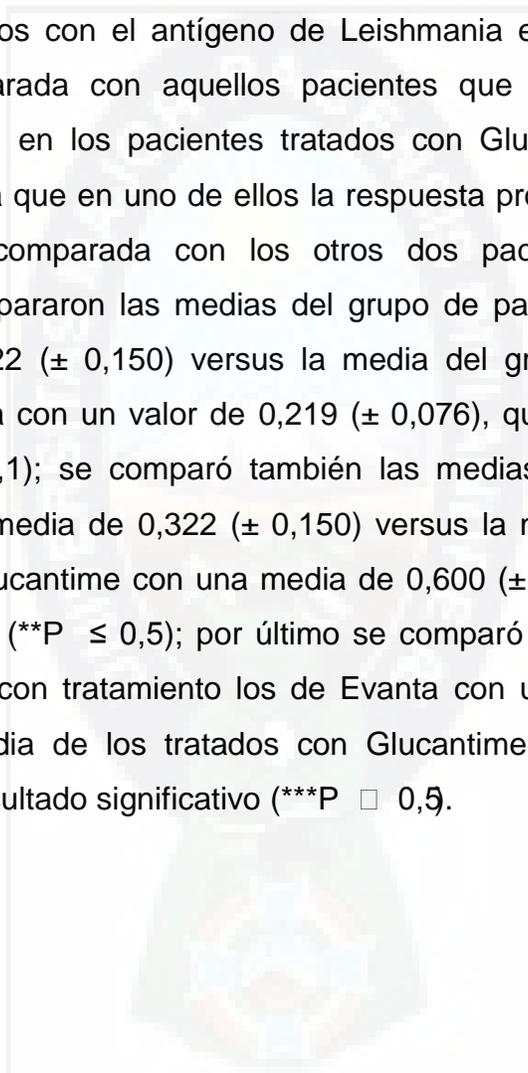
En la Gráfica 3, observamos que en los cultivos celulares de la población en estudio sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una proliferación celular mayor comparada con aquellos pacientes en tratamiento con Evanta, aunque existen pacientes sin tratamiento cuya proliferación celular es igual al de los pacientes que se tratan con Evanta. La comparación de las medias del grupo de pacientes sin tratamiento es de $0,335 (\pm 0,125)$ versus la media de los pacientes con tratamiento de Evanta de $0,204 (\pm 0,074)$ que nos da un resultado significativo ($p \leq 0,05$).

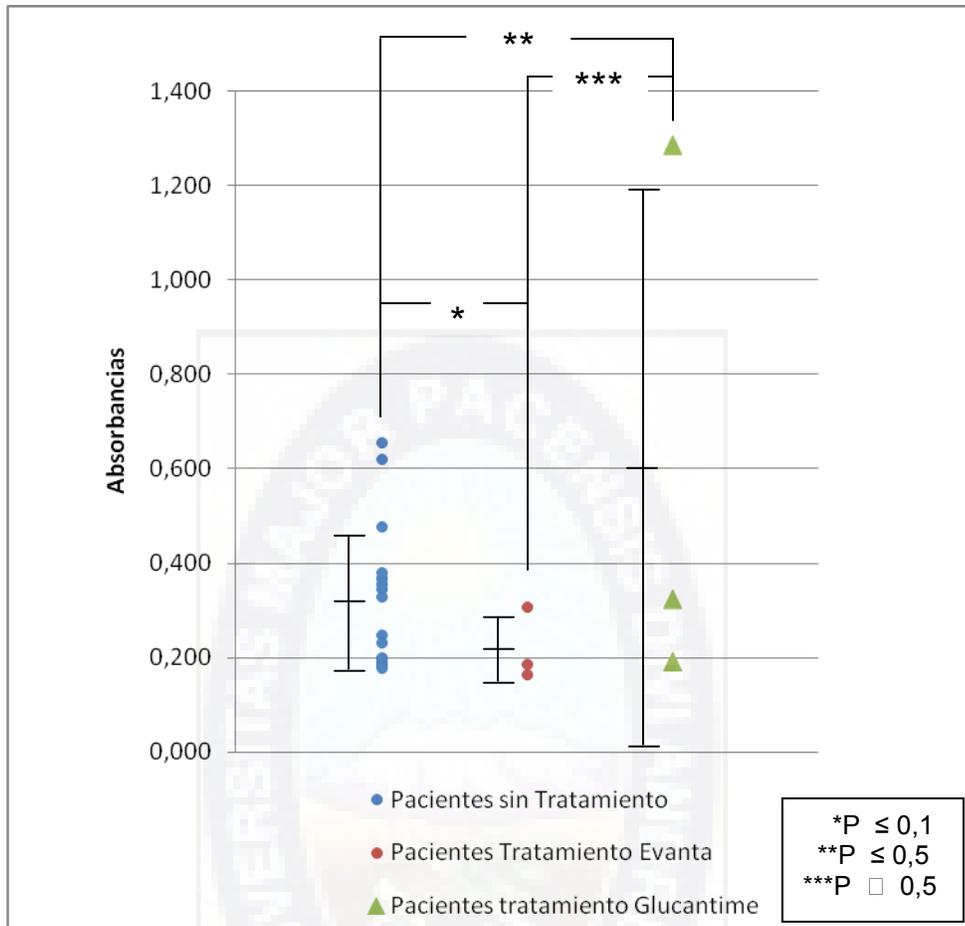


Gráfica 3. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento de Evanta estimulados con antígeno de *Leishmania braziliensis* ($0,335 \pm 0,125$ versus $0,204 \pm 0,074$, $p \leq 0,05$).

XI.3.2. Respuesta proliferativa inducida por Concanavalina A.

En la Gráfica 4, observamos que en los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de Leishmania existe una proliferación celular mayor comparada con aquellos pacientes que tenían tratamiento de Evanta, sin embargo, en los pacientes tratados con Glucantime, tenemos una marcada diferencia ya que en uno de ellos la respuesta proliferativa se encuentra totalmente elevada comparada con los otros dos pacientes con el mismo tratamiento. Se compararon las medias del grupo de pacientes sin tratamiento con un valor de $0,322 (\pm 0,150)$ versus la media del grupo de pacientes con tratamiento de Evanta con un valor de $0,219 (\pm 0,076)$, que nos da un resultado significativo ($*P \leq 0,1$); se comparó también las medias de los pacientes sin tratamiento con una media de $0,322 (\pm 0,150)$ versus la media de los pacientes con tratamiento de glucantime con una media de $0,600 (\pm 0,596)$, que nos da un resultado significativo ($**P \leq 0,5$); por último se comparó las medias de los dos grupos de pacientes con tratamiento los de Evanta con una media de $0,219 (\pm 0,076)$ versus la media de los tratados con Glucantime $0,600 (\pm 0,596)$, que también nos da un resultado significativo ($***P \leq 0,5$).





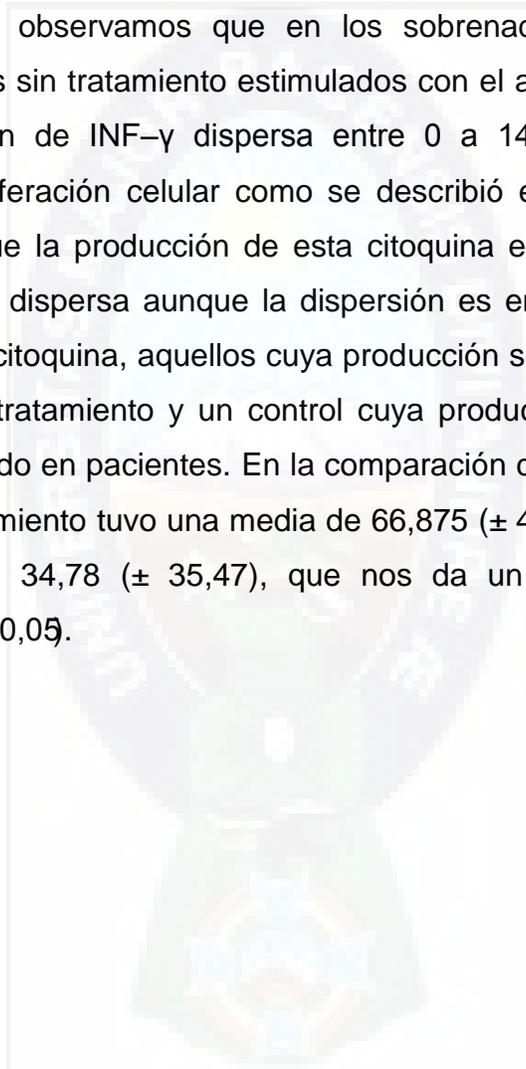
Gráfica 4. Respuesta proliferativa de pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A, ($0,322 \pm 0,150$ versus $0,219 \pm 0,076$, $*P \leq 0,1$; $0,322 \pm 0,150$ versus $0,600 \pm 0,596$, $**P \leq 0,5$; $0,219 \pm 0,076$ versus $0,600 \pm 0,596$, $***P \leq 0,5$).

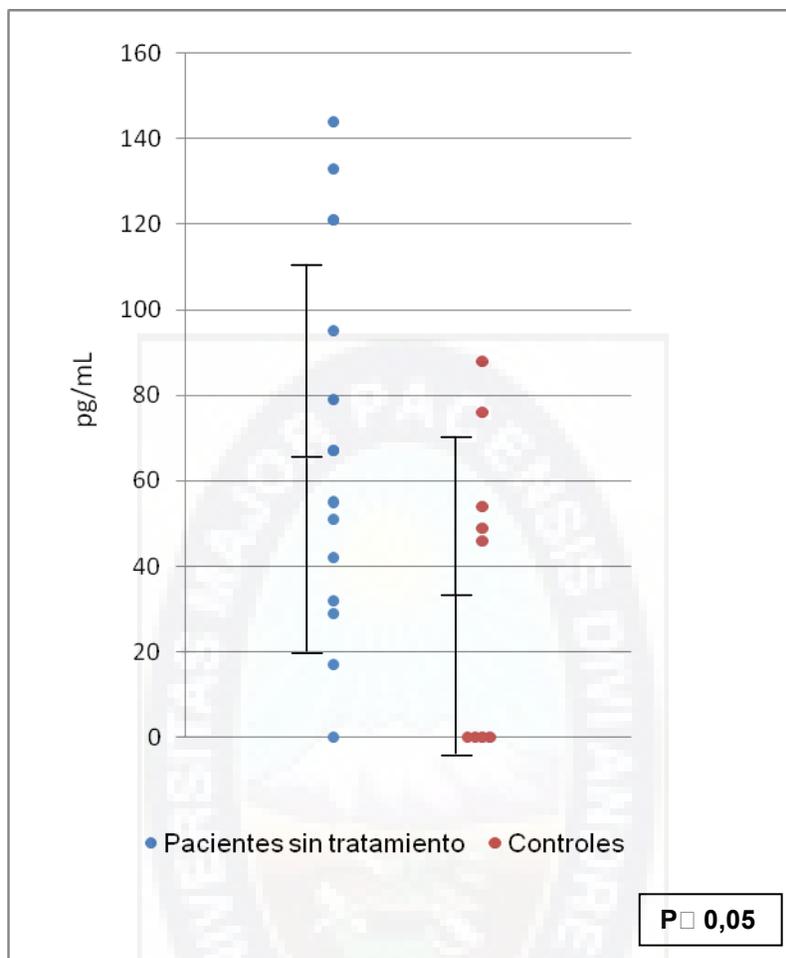
XI.4. Producción de Citoquinas en pacientes sin tratamiento versus grupo control.

La producción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se cuantificó mediante la técnica de ELISA, se procesaron los sobrenadantes de los cultivos celulares del grupo en estudio sin tratamiento y del grupo control.

XI.4.1. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de antígeno de *Leishmania braziliensis* (WHO 2305).

En la Gráfica 5, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una producción de INF- γ dispersa entre 0 a 144 pg/mL lo cual está relacionado a la proliferación celular como se describió en la figura 1, además podemos observar que la producción de esta citoquina en el grupo control, se encuentra igualmente dispersa aunque la dispersión es en tres grupos, aquellos que no produjeron la citoquina, aquellos cuya producción se encuentra similar a la de los pacientes sin tratamiento y un control cuya producción se encuentra por encima del valor hallado en pacientes. En la comparación de las medias, el grupo de pacientes sin tratamiento tuvo una media de 66,875 (\pm 44,891) versus la media del grupo control de 34,78 (\pm 35,47), que nos da un resultado significativo estadísticamente ($P \leq 0,05$).

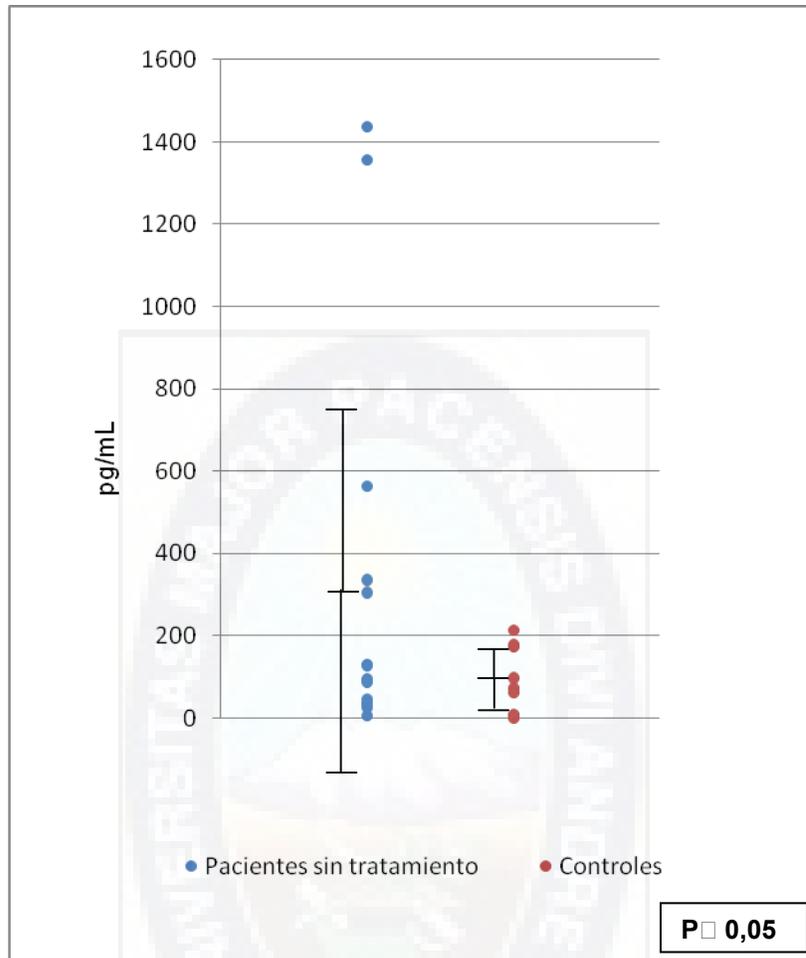




Gráfica 5. Producción de INF- γ en pg/mL de pacientes sin versus controles aparentemente sanos, estimulado con Antígeno de *Leishmania braziliensis*. ($66,875 \pm 44,89$ versus $34,78 \pm 35,47$, $P \leq 0,05$).

XI.4.2. Producción de IL-10 bajo el estímulo de antígeno de *Leishmania braziliensis*.

En la Gráfica 6, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una producción de IL-10 dispersa de manera bimodal, aquellos cuyo valor se aproxima a los 1500 pg/mL, y aquellos que van de 0 a 600 pg/mL, en cuanto al grupo control, estos se encuentran entre 0 a 200 pg/mL. En la comparación de las medias, la media de los pacientes sin tratamiento fue de 294,75 ($\pm 455,28$) versus la media del grupo control de 81,4 ($\pm 81,8$), que nos da un valor significativo ($P \leq 0,05$).

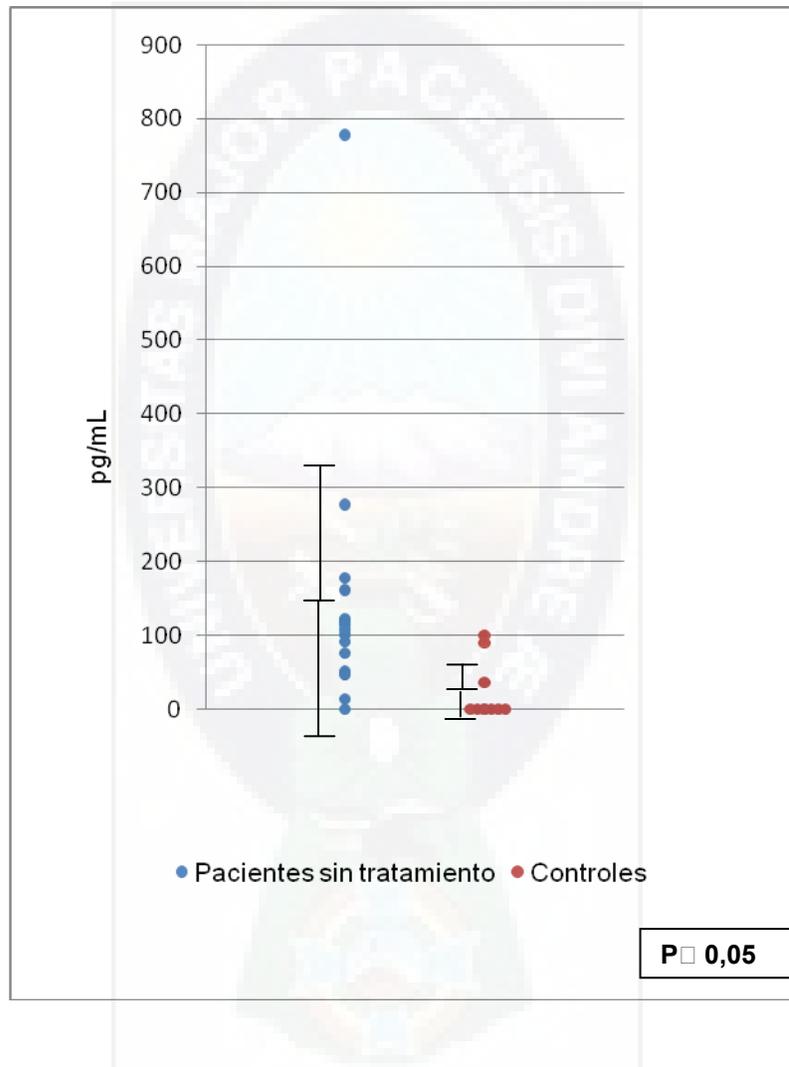


Gráfica 6. Producción de IL-10 estimulados con antígeno de *Leishmania braziliensis*. en pacientes sin tratamiento comparado con controles aparentemente sanos, ($294,75 \pm 455,28$ versus $81,4 \pm 81,8$, $P \leq 0,05$).

XI.4.3. Producción de TGF- β 1 bajo el estímulo de antígeno de *Leishmania braziliensis* (WHO 2305).

En la Gráfica 7, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una producción de TGF- β 1 dispersa en, aquellos cuyo valor varía entre 0 y 250 pg/mL, aquellos que no produjeron la citoquina y uno que tiene un valor hacia los 800 pg/mL, en cuanto al grupo control, la producción de la citoquina se

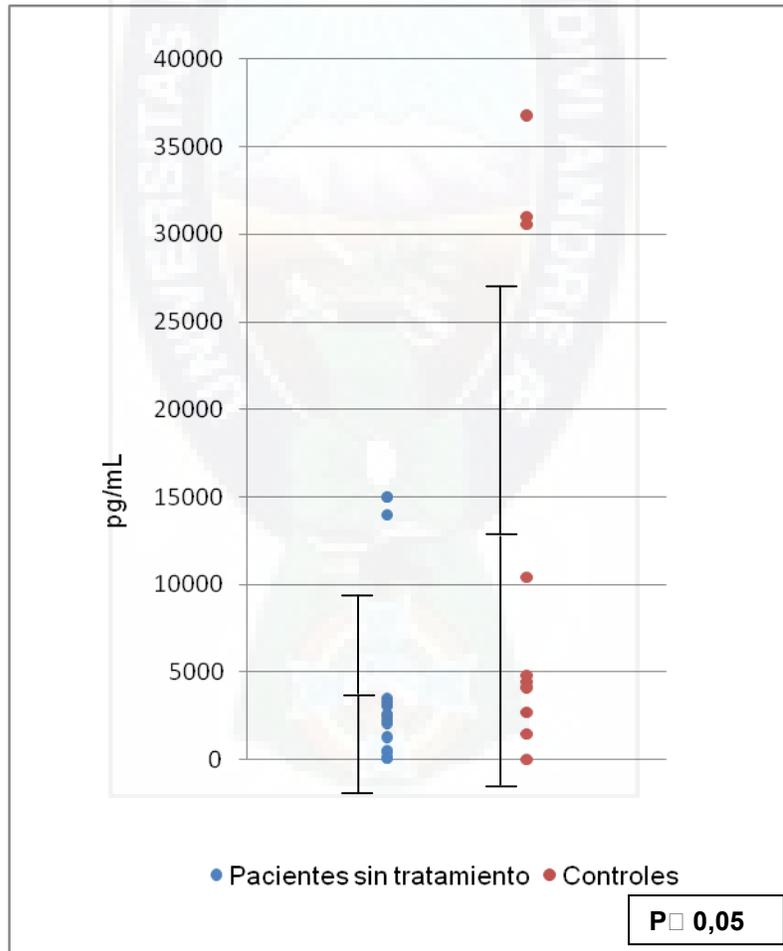
encuentra 0 y 100 pg/mL. En la comparación de las medias, la media de los pacientes sin tratamiento fue de 147,34 (\pm 180,73) versus la media del grupo control de 22,6 (\pm 39,84) que nos da un resultado significativo $P \leq 0,05$.



Gráfica 7. Producción de TGF- β 1 estimulados con antígeno de *Leishmania braziliensis* en pacientes sin tratamiento versus controles aparentemente sanos, (147,34 \pm 180,73 versus 22,6 \pm 39,84 $P < 0,05$).

XI.4.4. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de Concanavalina A.

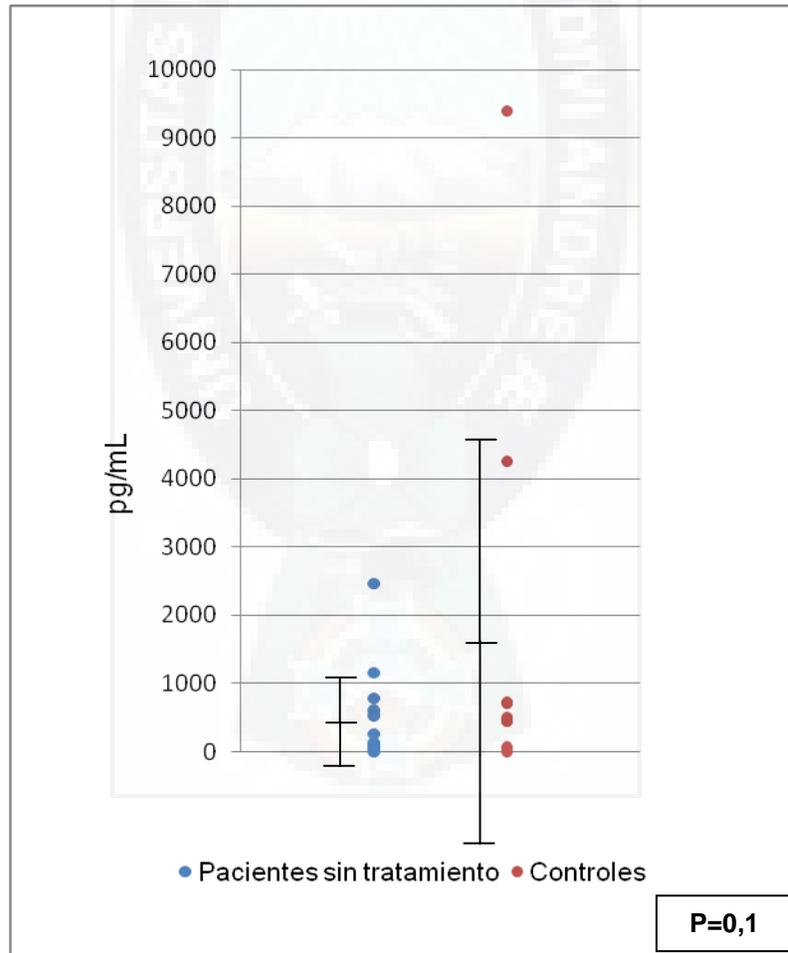
En la Gráfica 8, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con Concanavalina A existe una producción de INF- γ dispersa entre 0 a 4000 pg/mL y 14000 a 15000 p/mL, además podemos observar que la producción de esta citoquina en el grupo control, se encuentra igualmente dispersa aunque la producción en algunos pacientes se encuentra demasiado elevada entre 30000 a 40000 pg/mL. En la comparación de las medias, la media de los pacientes sin tratamiento fue de 4270,94 (\pm 5278,27) versus la media del grupo control de 12629,9 (\pm 14264,66), que nos da un resultado significativo ($P \leq 0,05$).



Gráfica 8. Producción de INF- γ en pg/mL de pacientes sin tratamiento versus controles aparentemente sanos, estimulado con Concanavalina A. (4270,94 \pm 5278,27 versus 12629,9 \pm 14264,66 $P \leq 0,05$).

XI.4.5. Producción de IL-10 bajo el estímulo de Concanavalina A.

En la Gráfica 9, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con Concanavalina A existe una producción de IL-10 similar a la producción del grupo control que están entre 0 a 1000 pg/mL, aunque existe un pacientes cuya producción se acerca a los 2500 pg/mL, aunque en el grupo control tenemos a dos cuyo valor sobre pasa los 4000 pg/mL. En la comparación de las medias, la media de los pacientes sin tratamiento fue de 403,94 ($\pm 640,69$) versus la media del grupo control de 1654,6 ($\pm 2996,56$), que nos da un resultado no significativo $P = 0,1$.

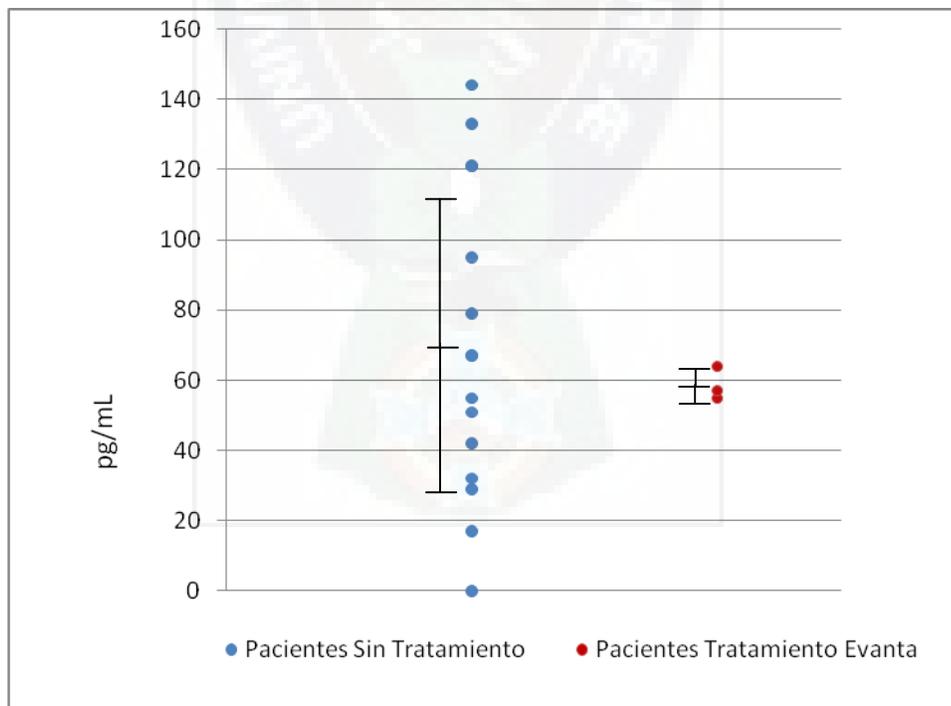


Gráfica 9. Producción de IL-10 estimulado con Concanavalina en pacientes sin tratamiento comparado con controles aparentemente sanos, ($403,94 \pm 640,69$ versus $1654,6 \pm 2996,56$, $P = 0,1$).

XI.5. Producción de Citoquinas en pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento.

XI.5.1. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de antígeno de *Leishmania braziliensis*.

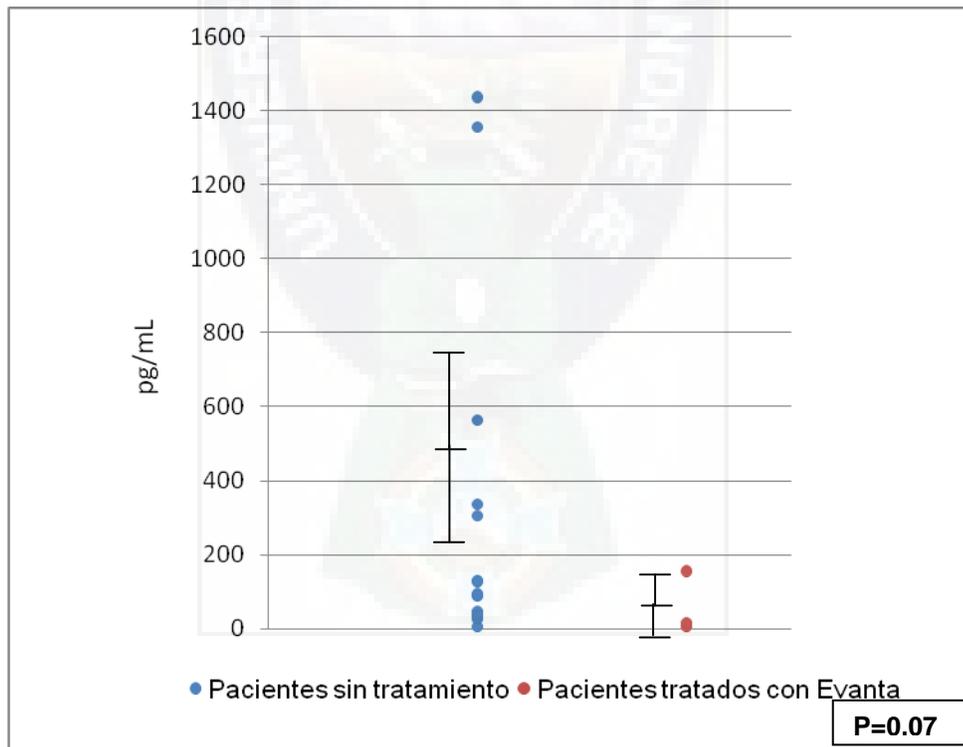
En la Gráfica 11, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una producción de INF- γ dispersa entre 0 a 144 pg/mL lo cual está relacionado a la proliferación celular como se describió en la figura 1, además podemos observar que la producción de esta citoquina en los pacientes que son tratados con evanta, se encuentra con un promedio de 58 pg/mL. En la comparación de las medias, en los pacientes sin tratamiento se obtuvo una media de 66,875 (\pm 44,891) versus la media de los pacientes con tratamiento de Evanta de 58,66 (\pm 4,725), que nos da un resultado significativo ($P = 0,4$).



Gráfica 11, producción de INF- γ en pg/mL de pacientes sin tratamiento versus pacientes cuyo tratamiento es Evanta, estimulado con Antígeno de *Leishmania braziliensis*. (66,875 \pm 44,891 versus 58,66 \pm 4,725, $P = 0,4$).

XI.5.2. Producción de IL-10 bajo el estímulo de antígeno de *Leishmania braziliensis*.

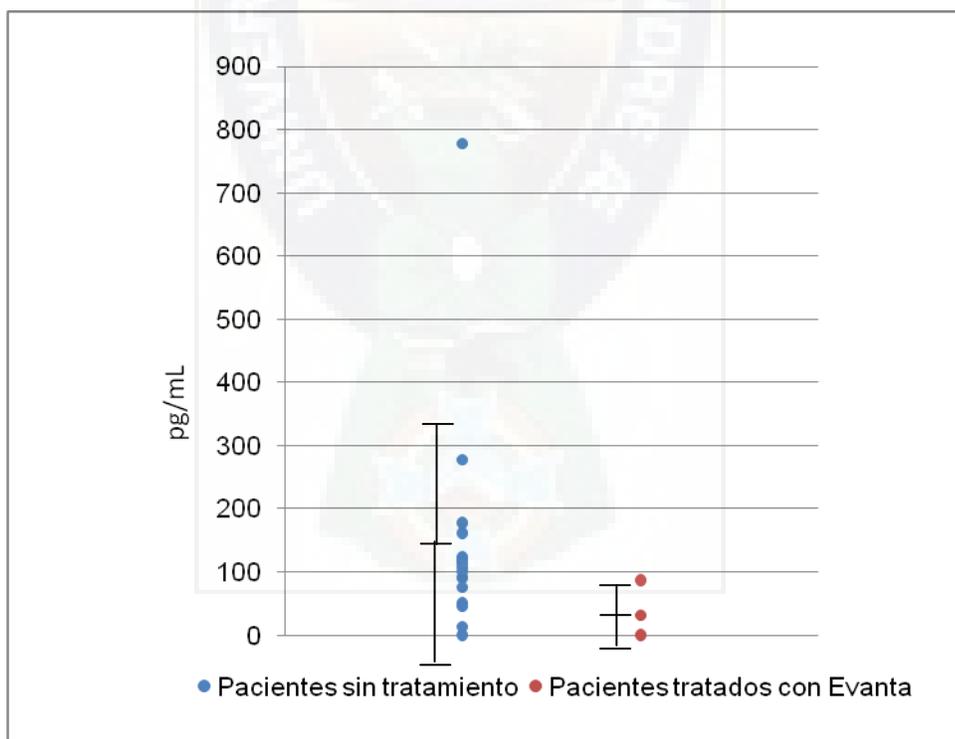
En la Gráfica 12, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una producción de IL-10 dispersión bimodal, aquellos cuyo valor se aproxima a los 1500 pg/mL, y aquellos que van de 0 a 600 pg/mL, en cuanto a los pacientes con tratamiento de Evanta, se encuentran con una producción entre 0 a 200 pg/mL. En la comparación de las medias, en los pacientes sin tratamiento, se obtuvo una media de 294,27 (\pm 455,28) versus la media de los pacientes cuyo tratamiento es evanta de 59,6 (\pm 83,61), que nos da un resultado no significativo ($P = 0,07$).



Gráfica 12. Producción de IL-10 estimulados con antígeno de *Leishmania braziliensis*. en pacientes sin tratamiento comparado con pacientes con tratamiento de Evanta. (294,27 \pm 455,28 versus 59,6 \pm 83,61, $P = 0,07$).

XI.5.3. Producción de TGF-β1 bajo el estímulo de antígeno de *Leishmania braziliensis*.

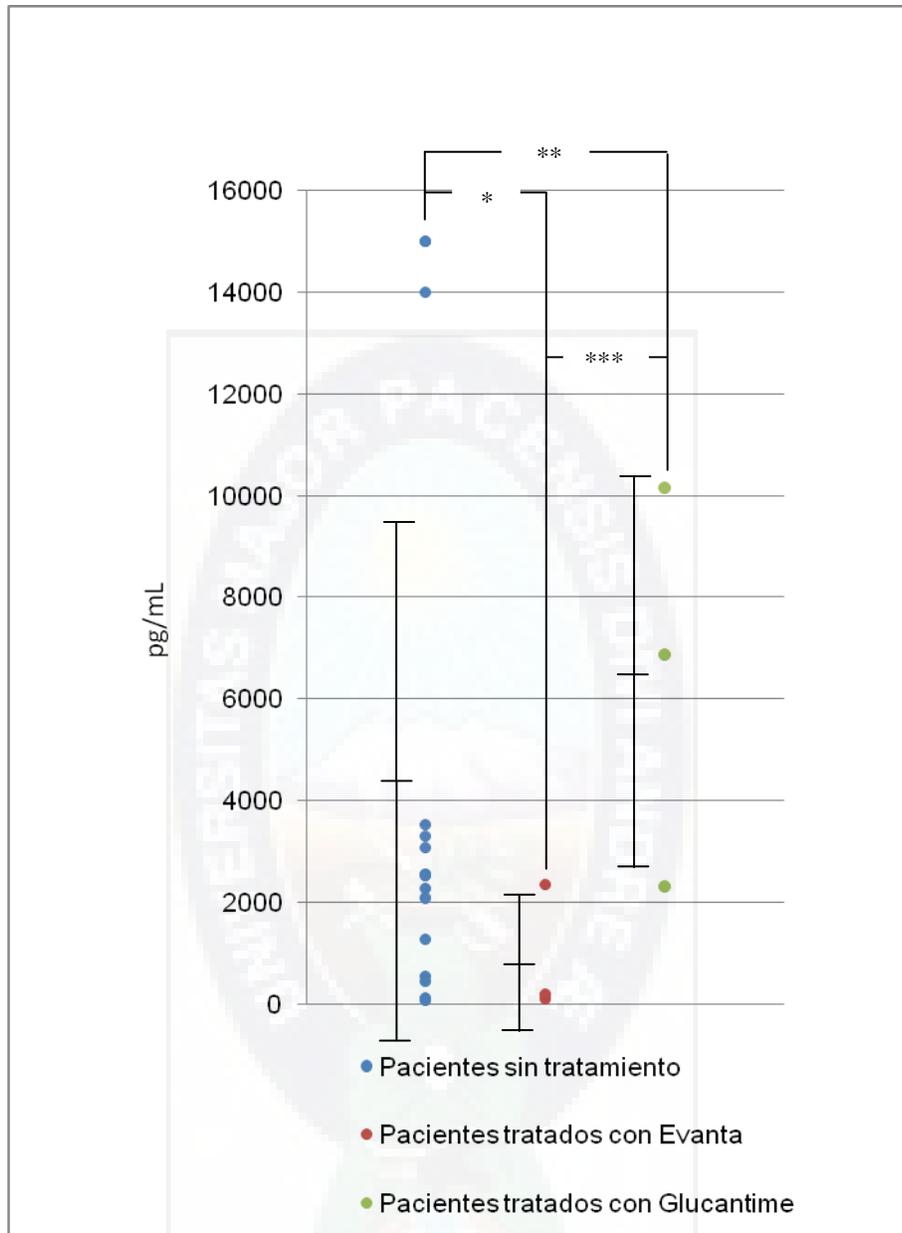
En la Gráfica 13, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con el antígeno de *Leishmania* existe una producción de TGF-β1 dispersa en, aquellos cuyo valor varía entre 100 y 150 pg/mL, aquellos que no produjeron la citoquina y dos que tienen valor hacia los 300 pg/mL, en cuanto a los pacientes con tratamiento de Evanta, se encuentran igualmente dispersos, aquellos que no produjeron la citoquinas y un paciente que tiene una producción de 87 pg/mL. En la comparación de las medias, en los pacientes sin tratamiento se obtuvo una media de 147,34 ($\pm 180,73$) versus la media de los pacientes con tratamiento de Evanta de 39,77 ($\pm 44,0$), que nos da un resultado significativo estadísticamente ($P = 0,05$).



Gráfica 13. Producción de TGF-β1 estimulado con antígeno de *Leishmania braziliensis* en pacientes sin tratamiento versus pacientes con tratamiento de Evanta, ($147,34 \pm 180,73$ versus $39,77 \pm 44,0$, $P = 0,05$).

XI.5.4. Producción de Interferón- γ bajo el estímulo de Concanavalina A.

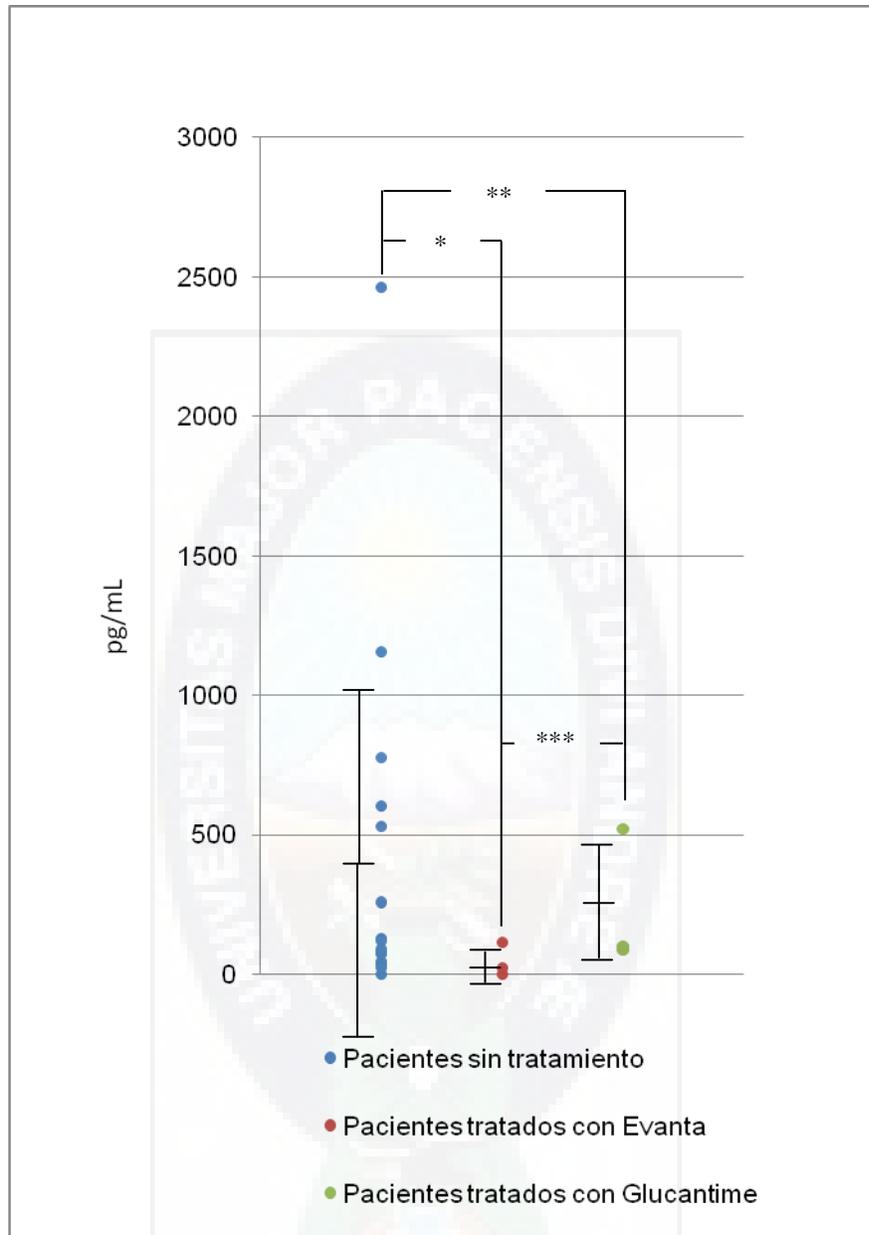
En la Gráfica 14, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con Concanavalina A existe una producción de INF- γ dispersa entre 0 a 4000 pg/mL y 14000 a 15000 p/mL, además podemos observar que la producción de esta citoquina en el grupo de pacientes que se tratan con Evanta se encuentra entre 0 y 3000 pg/mL similar al primer grupo de los pacientes sin tratamiento, los pacientes que se tratan con glucantime, la producción presenta una dispersión, aunque solo tenemos 3 pacientes, uno de ellos sobrepasa los 10000 pg/mL y los otros 2 tienen valores entre 2000 a 8000 pg/mL. Se compararon las medias del grupo de pacientes sin tratamiento con un valor de 4270,94 (\pm 5278,27) versus la media del grupo de pacientes con tratamiento de Evanta con un valor de 877,33 (\pm 1267,51), que nos da un resultado significativo (*P = 0,03); se comparó también las medias de los pacientes sin tratamiento con una media de 4270,94 (\pm 5278,27) versus la media de los pacientes con tratamiento de glucantime con una media de 6443,33 (\pm 3937,38), que nos da un resultado no significativo estadísticamente ,(**P = 0,4); por último se comparó las medias de los dos grupos de pacientes con tratamiento los de Evanta con una media de 877,33 (\pm 1267,51) versus la media de los tratados con Glucantime 6443,33 (\pm 3937,38), que también nos da un resultado no significativo (**P = 0,1).



Gráfica 14. Producción de INF- γ en pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A, ($4270,94 \pm 5278,27$ versus $877,33 \pm 1267,51$, * $P = 0,03$; $4270,94 \pm 5278,27$ versus $6443,33 \pm 3937,38$, ** $P = 0,4$; $877,33 \pm 1267,51$ versus $6443,33 \pm 3937,38$, *** $P = 0,1$).

XI.5.5. Producción de IL-10 bajo el estímulo de Concanavalina A.

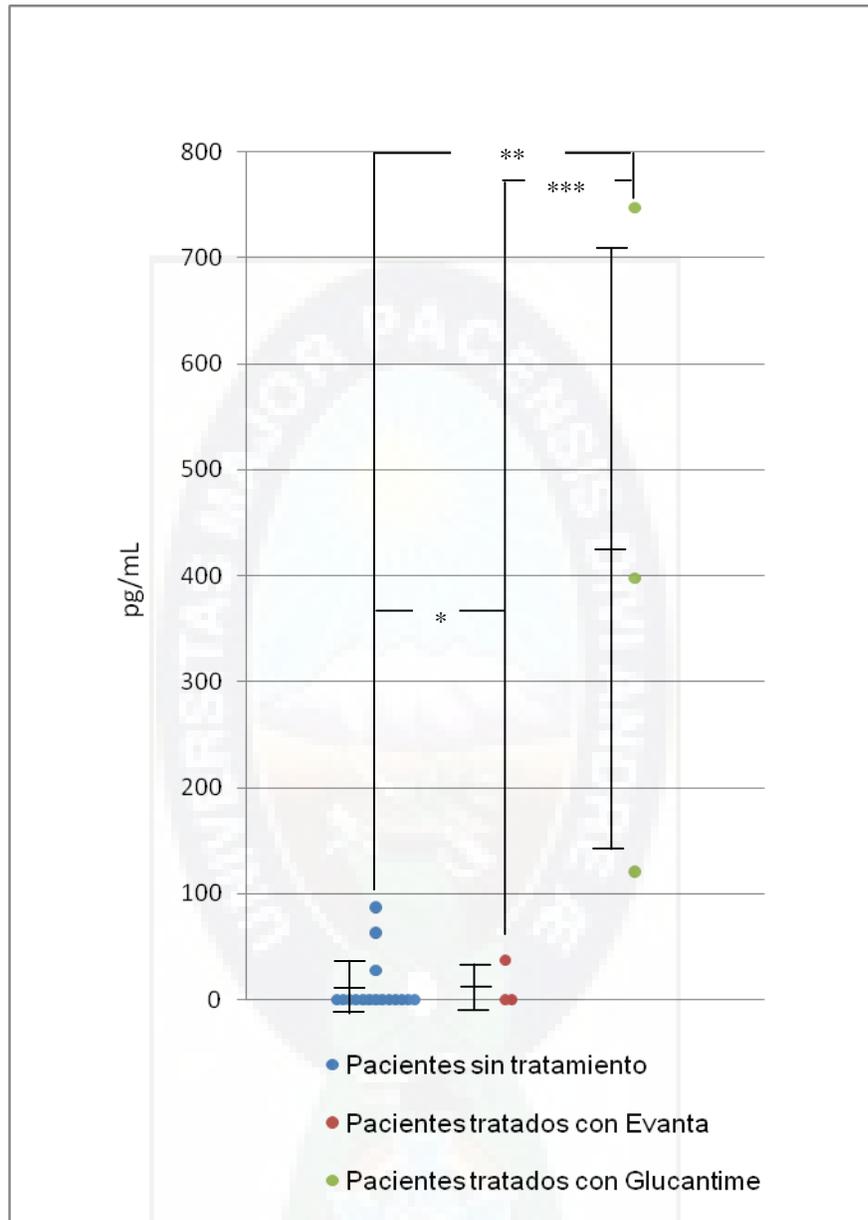
En la Gráfica 15, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con Concanavalina A existe una producción de IL-10 que se encuentra entre 0 a 1200 pg/mL, aunque existe un pacientes cuya producción se acerca a los 2500 pg/mL, la producción de la citoquina por los pacientes tratados con Evanta se encuentra disminuida comparada con los pacientes sin tratamiento, en cuanto a los pacientes que se tratan con glucantime su producción se encuentra por debajo de 500 pg/mL. Se compararon las medias del grupo de pacientes sin tratamiento con un valor de 403,94 (\pm 640,69) versus la media del grupo de pacientes con tratamiento de Evanta con un valor de 46,33 (\pm 60,66), que nos da un resultado significativo (*P = 0,04); se comparó también las medias de los pacientes sin tratamiento con una media de 403,94 (\pm 640,69) versus la media de los pacientes con tratamiento de glucantime con una media de 236,66 (\pm 247,24), que nos da un resultado significativo (**P = 0,4); por último se comparó las medias de los dos grupos de pacientes con tratamiento los de Evanta con una media de 46,33 (\pm 60,66) versus la media de los tratados con Glucantime 236,66 (\pm 247,24), que también nos da un resultado significativo (**P = 0,3).



Gráfica 15. Producción de IL-10 en pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A, ($403,94 \pm 640,69$ versus $46,33 \pm 60,66$, $*P = 0,04$; $403,94 \pm 640,69$ versus $236,66 \pm 247,24$, $**P = 0,4$; $46,33 \pm 60,66$ versus $236,66 \pm 247,24$, ($***P = 0,3$).

XI.5.6. Producción de TGF-β1 bajo el estímulo de Concanavalina A.

En la Gráfica 16, observamos que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de pacientes sin tratamiento estimulados con Concanavalina A existe una producción de TGF-β1 disminuida donde la mayor parte de los pacientes tienen una producción de 0 pg/mL, sin embargo existen otros tantos cuya producción, se encuentra entre 20 y 100 pg/mL, en los pacientes que se tratan con Evanta la producción de esta citoquina es similar a la producción de los pacientes sin tratamiento, ya que sus valores están en 0 pg/mL, y un paciente cuyo valor se aproxima a 100 pg/mL, en cuanto a los pacientes que se tratan con Glucantime, la producción está muy dispersa, ya que tenemos un paciente que no tiene producción de citoquina, un paciente cuyo valor es de 400 pg/mL, y el último que sobre pasa los 700 pg/mL. Se compararon las medias del grupo de pacientes sin tratamiento con un valor de 11,13 ($\pm 26,26$) versus la media del grupo de pacientes con tratamiento de Evanta con un valor de 12,33 ($\pm 21,36$), que nos da un resultado no significativo estadísticamente (*P = 0,9); se comparó también las medias de los pacientes sin tratamiento con una media de 11,13 ($\pm 26,26$) versus la media de los pacientes con tratamiento de Glucantime con una media de 422 ($\pm 313,69$), que nos da un resultado significativo (**P = 0,1); por último se comparó las medias de los dos grupos de pacientes con tratamiento los de Evanta con una media de 12,33 ($\pm 21,36$) versus la media de los tratados con Glucantime 422 ($\pm 313,69$), que también nos da un resultado significativo (**P = 0,1).



Gráfica 16. Producción de TGF-β1 en pacientes sin tratamiento versus pacientes tratados con Evanta, y pacientes tratados con Glucantime estimulados con Concanavalina A. (11,13 ±26,26 versus 12,33 ± 21,36, *P = 0,9; 11,13 ±26,26 versus 422 ±313,69, **P = 0,1; 12,33 ± 21,36 versus 422 ±313,69, ***P = 0,1.

XII. Discusión.

En el presente trabajo, el objetivo general fue evaluar el estado inmunológico de pacientes con Leishmaniasis cutánea mediante la respuesta proliferativa y producción de citoquinas, ya que como se mencionó, la respuesta inmune en el caso de la leishmaniasis es fundamental en el desarrollo de la infección. En cuanto a la respuesta inmunitaria en humanos con Leishmaniasis, está siendo estudiada desde hace varios años, ya que no está totalmente clara; al ser este estudio parte del Proyecto “Enfermedades Infecciosas, Nuevas Terapias: E vanta en el Tratamiento de Leishmaniasis cutánea”, es elemental que se realice esta evaluación. Se ha estudiado con bastante énfasis que los pacientes con Leishmaniasis cutánea presentan un patrón de respuesta inmune tipo Th1, lo cual conduce a la curación de las lesiones en estos pacientes, ya sea espontáneamente o luego de una terapia apropiada (41), además de que las formas diseminadas de los pacientes con LCD, resistentes a la quimioterapia, se caracterizan por un patrón de citoquinas tipo Th2, con una ausencia total de producción de IL2 e INF- γ . Este tipo de respuesta Th2 probablemente es la responsable de que estos pacientes sean incapaces de controlar la infección, lo cual conduce a la diseminación del parásito por toda la superficie cutánea, (41) a pesar de estos estudios, la respuesta inmune frente a este parásito en humanos todavía no está bien establecida.

En el presente estudio, las células mononucleares de sangre periférica del grupo de pacientes en estudio sin tratamiento respondieron fuertemente a la prueba de proliferación celular al ser estas estimuladas con antígeno de *Leishmania braziliensis*, comparadas con el grupo control, aunque se pudo evidenciar que el 18% de este grupo respondieron débilmente a esta estimulación. A pesar de esta dispersión de datos, la comparación entre los grupos de estudio estableció que existen diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que los pacientes que respondieron débilmente al desafío, son pacientes en su mayoría de edad adolescente. Aquellos pacientes cuya proliferación celular fue

bastante alta, son pacientes de sexo masculino, cuya edad media es de 35 años, y al momento de su toma de muestra, ellos refirieron un tiempo prolongado con la lesión de aproximadamente 60 a 90 días, esto se pudo reflejar incluso por el tamaño de las mismas (de 30 a 45 mm diámetro); estudios previos (41) demostraron que pacientes con Leishmaniasis cutánea localizada, presentan respuestas proliferativas fuertes frente a antígenos de Leishmania.

En nuestro estudio se utilizó también Con A como estimulante, en este caso observamos que los pacientes respondieron al test de proliferación de manera similar al grupo control (como era de esperarse, pues se trata de un activador policlonal). La comparación de los resultados mostró un valor estadísticamente no significativo. Estos datos los podemos correlacionar con estudios (41) donde una alta proporción de los pacientes con Leishmaniasis mucocutánea y sus controles responden de manera similar a la fitohemaglutinina, el cual es también un mitógeno como la Concanavalina A.

Se comparó también la respuesta proliferativa tanto inducida por el antígeno de Leishmania *braziliensis* como por Concanavalina A en la población en estudio tanto los pacientes sin tratamiento como aquellos que iniciaron tratamiento. Dentro de estos últimos tuvimos 2 subgrupos, aquellos que fueron tratados con Glucantime y aquellos tratados con Evanta. En estos resultados observamos que en los pacientes que fueron tratados con Evanta la respuesta proliferativa con ambos estímulos es menor al promedio de la respuesta proliferativa de los pacientes sin tratamiento. Sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa, aunque no es posible establecer ninguna conclusión ya que el número de muestras analizadas (en el grupo de pacientes con tratamiento) es muy bajo.

Con relación a la producción de citoquinas analizadas; la respuesta proliferativa se relaciona bastante bien con la producción de INF- γ , y en este caso los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes control y el grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis

cutánea sin tratamiento a pesar de la dispersión que se observa, y que varios de los pacientes del grupo control también produjeron la citoquina, pero se pudo detectar concentraciones más elevadas de INF- γ en los sobrenadantes de los cultivos de los pacientes comparada con los de los controles.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, correlacionan con estudios (40), donde mencionan que antes de recibir la inmunoterapia, los pacientes con Leishmaniasis cutánea, ya presentan una respuesta inicial a antígenos de *Leishmania* donde los linfocitos CD4+ son capaces de proliferar y producir INF- γ .

La producción de IL-10 del grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis cutánea sin tratamiento se encuentra incrementada comparando con el grupo de pacientes control, esto nos da un dato estadísticamente significativo, en cuanto a los valores de los controles algunos de ellos son altos igualmente comparados con la producción de INF- γ , estos datos podrían estar relacionados con una respuesta de tipo TH₂ aunque en nuestro estudio tenemos claramente que la producción de INF- γ no fue inhibida, Se señala que el padecimiento se presenta en realidad por una sobreactivación de la respuesta inmunitaria al presentar bajos niveles de IL-10 y que la curación depende más de la relación entre las citocinas producidas y menos de la mera presencia o ausencia de citocinas en particular (24). Al margen de cuantificar la producción de IL-10, también se cuantificó la producción de TGF- β 1, ya que la citoquina IL-10 y el TGF- β son reconocidas citocinas moduladoras de la respuesta inmune; en leishmaniasis las células recién infectadas, y las células T reguladoras CD4+CD25+ FoxP3+, liberan estas citocinas, modulando la respuesta hacia un patrón Th2, lo que inhibe: activación de los macrófagos, presentación antigénica, expansión / proliferación clonal de los linfocitos T y liberación de citocinas pro-inflamatorias (26). En nuestros resultados tenemos que tanto para estímulo con antígeno como con Concanavalina A la producción de esta citoquina se encuentra disminuida en relación a la producción de INF- γ e IL-10, en especial al estímulo de Concanavalina A donde se tiene los más bajos valores. Sin embargo los resultados de la producción de TGF- β son

estadísticamente significativos comparando la producción entre el grupo de pacientes control y el grupo de pacientes diagnosticados con Leishmaniasis cutánea sin tratamiento en respuesta al estímulo de antígeno de Leishmania, este dato es muy importante ya que TGF- β es otra citocina importante en la modulación de la respuesta inmune en leishmaniasis experimental (26). Por una parte se ha señalado que la producción de TGF- β es inducida por el parásito y constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica del hospedador al suprimir a los linfocitos T CD4+ Th1 (26).

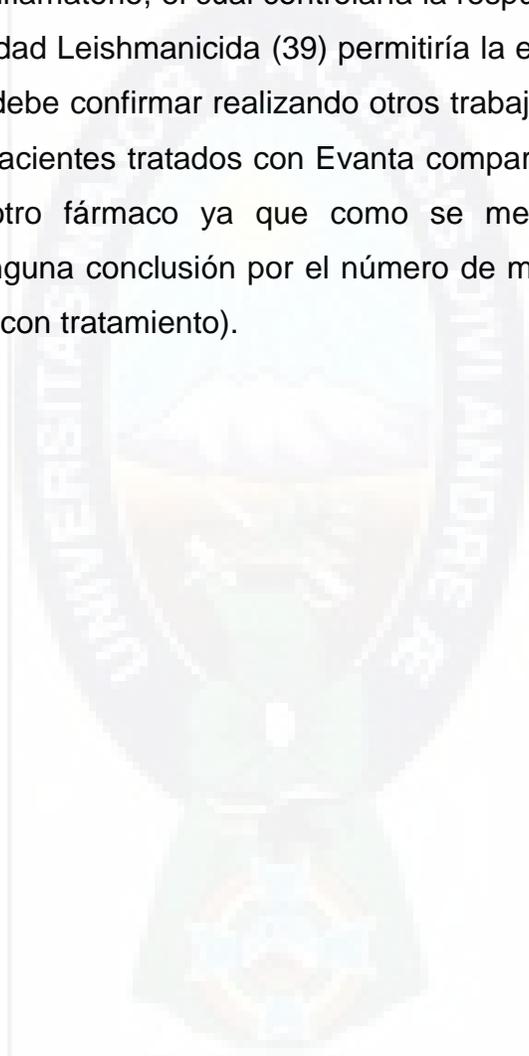
En cuanto a la comparación que se hizo entre el grupo de pacientes sin tratamiento con el grupo de pacientes con tratamiento podemos decir que la producción de INF- γ en los pacientes tratados con Evanta se acerca al promedio de la producción de los pacientes sin tratamiento, tanto por estimulación con antígeno como por Concanavalina A, en cambio en los pacientes tratados con Glucantime, la producción es un poco más elevada que la de los tratados con Evanta, estos datos podrían sugerir que los pacientes tratados con Evanta presentan una mejor regulación de la respuesta inmune comparados con los pacientes tratados con Glucantime.

La producción de IL-10 se encuentra también disminuida en ambos subgrupos de pacientes con tratamiento comparados con la producción de los pacientes sin tratamiento, esto puede deberse a que los pacientes que ya iniciaron un tratamiento podrían estar ingresando en un equilibrio en su respuesta inmune.

Por último, la producción de TGF- β 1 se encuentra disminuida en pacientes tratados con Evanta bajo el estímulo de ConA, esto puede deberse como ya se había mencionado a que estos pacientes estarían ingresando a un correcto estado de equilibrio inmunológico; sin embargo la producción de esta citoquina en pacientes tratados con Glucantime de la misma forma estimulados con ConA, se encuentra elevada, en especial en dos pacientes, uno de ellos presenta una mayor producción, lo que correlaciona con proliferación celular también elevada y la producción de INF- γ en este paciente estaría disminuida, lo que nos lleva a

suponer que podría estar asociado a una respuesta Th2, sin embargo de acuerdo a su historia clínica el paciente (a la fecha) habría curado la lesión.

Con todo esto podemos decir que Evanta tiene un efecto tanto leishmanicida como inmuno modulador, ya que estudios previos muestran que el extracto de Evanta podría afectar la funcionalidad de células *in vitro* (39) lo que podría ser un indicio de efecto antiinflamatorio, el cual controlaría la respuesta inflamatoria, y por otro lado por su actividad Leishmanicida (39) permitiría la eliminación del parásito; aunque este dato se debe confirmar realizando otros trabajos donde se tenga una mayor población de pacientes tratados con Evanta comparado con pacientes que sean tratados con otro fármaco ya que como se mencionó no es posible establecer todavía ninguna conclusión por el número de muestras analizadas (en el grupo de pacientes con tratamiento).



XIII. Conclusiones.

En conclusión, se evaluó la respuesta proliferativa y producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis Cutánea.

Los resultados tienen bastante relación con la bibliografía revisada (39,40,41), ya que además pudimos establecer diferencias en la respuesta proliferativa del grupo en estudio con el grupo control donde los resultados muestran diferencias estadísticas significativas,

Se logró establecer las diferencias estadísticamente significativas en la respuesta proliferativa de pacientes con Leishmaniasis activa sin tratamiento y grupo control, donde el primer grupo presentó una respuesta proliferativa alta comparado con el segundo.

Se logró cuantificar la producción de Interferón Gamma (γ), Interleuquina 10 (IL-10) y Factor Transformante de crecimiento β (TGF - β) de Linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea y grupo control mediante la técnica de ELISA, donde la producción de todas las citoquinas del grupo en estudio fueron elevadas en especial INF- γ la cual tuvo los valores más elevados comparados con la producción de las citoquinas en el grupo control.

Al margen de esto también logramos verificar de forma preliminar que la administración de Evanta como tratamiento en pacientes con leishmaniasis cutánea tiene un efecto de regulación en proliferación celular y producción de citoquinas que tiene relación a otros estudios realizados in vitro donde mencionan que este extracto tiene una interferencia en la activación tanto de células murinas como células T humanas ya que se observó una reducción de la proliferación celular y la producción de INF γ , que podrían contribuir al control de la reacción inflamatoria crónica que caracteriza a la infección por Leishmania (30), pero como

ellos mismos lo mencionan, los estudios *in vivo* en una mayor población son necesarios para corroborar este hallazgo ya que este es un trabajo inicial piloto, por el número reducido de muestras.



XIV. Recomendaciones.

Se han realizado importantes avances acerca del conocimiento acerca de la inmunología de la Leishmaniasis, sin embargo aún hay mucho que estudiar, sobre todo la respuesta inmune en pacientes que son tratados con los diferentes fármacos. En el presente trabajo observamos de forma preliminar que la administración de EAE como tratamiento alternativo en pacientes con leishmaniasis cutánea tiene un efecto de regulación en proliferación celular y producción de citoquinas, sin embargo como ya se mencionó, es necesario incrementar la población de estudio para corroborar este hallazgo, considerándose el presente, un trabajo inicial piloto. Más aún cuando se trata de los pacientes con tratamiento, Ya sea con glucantime o con Evanta. Es importante, también, que la momento de realizar el este tipo de estudios se realice un seguimiento mas controlado a los pacientes, en cuanto a la correcta administración de sus fármacos. Se debe también controlar el estado nutricional y la presencia de alguna otra patología al margen de Leishmaniasis de estos pacientes.

XV.- Bibliografía.

1. Gimenez Alberto "Estudios químicos Biológicos y Farmacológicos de **GALIPEA LONGIFLORA**" KRAUSE , Revista Boliviana de Química vol2 N° 1- 2005.
2. LEISHMANIOSIS Dra. Teresa Uribarren Berrueta Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
3. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/leishmaniosis.php>
4. LEISHMANIASIS, Guía operativa para el control en Bolivia, Primera Edición, 2007.
5. The kinetoplast-mitochondrion http://dna.kdna.uda.edu/parasite_course-old/kdna/subchapters/kdna1.htm.
6. BOTERO David, RESTREPO Marcos, "Parasitosis Humanas", cuarta edición, Corporación para investigaciones biológicas, Medellín, Colombia, 2005, pp 239 - 260.
7. <http://www.doogweb.es/2010/07/23/leishmaniosis-en-los-perros-mitos-y-realidades-i/>
8. CDC SAFER-HEALTHIER-PEOPLE <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.
9. R Rosilved*, B Silva. Factores de riesgo involucrados en la infección por Leishmania infantum / L. chagasi. Risk factors involved in Leishmania infantum / L. chagasi Infection. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel ISSN 0798-0477 versión impresa INHRR v.39 n.2 Caracas dic. 2008
10. PALOMO Iván, FERREIRA Arturo, "Fundamentos de Inmunología", editorial Universidad de Talca, Chile 1998, pp 379- 400.
11. <http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Interferon-gamma>
12. http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=Page&ID=1C8DEDA2-C779-438D-9B7F-1E5DF961ACE0&WT.mc_id=go_IFNgELISA_pw
13. <http://hea.wyzgo.es/index.php?PageURL=articles/i/n/t/Interferon-gamma.php>
14. Fisiología de la Respuesta Inmune. Patricia Abumohor G. Inmunóloga y Reumatóloga, Sección de Medicina, Clínica Las Condes Sección de Inmunología, Hospital Clínico, Universidad de Chile. 5Reumatología 2005; 21(2):51-57
15. http://es.wikipedia.org/wiki/Factor_de_necrosis_tumoral

16. <http://www.scribd.com/doc/4743889/citocinas.e.interleucinas#?=&cb=f2ca42f45a6205&relation=parent.parent&transport=fragment&type=resize&height=21>.

17. <http://www.uco.es/grupos/inmunologia.molecular/inmunologia/tema09/etexto09.htm>

18. K. Asadullah , W. Sterry y HD Volk. La interleucina-10-Revisión de la terapia de un nuevo enfoque doi: 10.1124/pr.55.2.4 Pharmacological Reviews June 2003 vol. 55 no. 2 241-269

19. http://es.wikipedia.org/wiki/TGF-beta_1

Cutánea, salud pública de México/vol48, no 5, Septiembre/Octubre 2006.

20. HERNANDEZ Ruiz, Joselín, “Linfocitos T citotóxicos CD8+ en Leishmaniasis

21. AMIT Awasthi, RAN KUMAR Mathur & BHASKAR Saha, “Immune response to Leishmania infection”, Review Article, Indian J Med Res 119, June 2004, pp 238 - 258.

22. <http://www.medicamentos.com.mx/DocHTML/26770.htm>

23. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a042.htm>

24. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea Joselín Hernández-Ruiz, M en C, Ingeborg Becker, Dra en Inmunol. Salud Pública Méx 2006; Vol. 48(5):430-439

25. “Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation”

L. R. V. ANTONELLI*, W. O. DUTRA†, R. P. ALMEIDA‡, O. BACELLAR‡ & K. J. GOLLOB* * *Department of Biochemistry- Immunology and † Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte and‡Immunology Service, Hospital Edgar Santos, UFBA-Salvador, BA, Brazil.* Clin Exp Immunol 2004; **136** :341–348

26. Citocinas reguladoras (IL-10 y TGF-β) en pacientes con leishmaniasis cutánea Americana. Maira Cabrera González*, Guillermo Terán-Ángel, Orquídea Rodríguez, Franca Puccio, Olga Zerpa & Jacinto Convit, BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL. Vol. L, N° 2, Agosto-Diciembre, 2010.

27. PAZ, Magali “Evaluación citotóxica/citostática, antibacteriana, antifúngica y cultivo in vitro de Galipea Krause” Tesina de la carrera de Bioquímica, 1998.

28. Rigor científico confirma valor curativo de la evanta. El Diario. www.eldiario.net. La

Paz - Bolivia. 15 de enero de 2006.

29. Fournet A, Vagneur B, Richomme P, Bruneton J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. Can J Chem. 1989; 67: 2116-2118.

30. Fournet A, Hocquemiller R, Roblot F, Cave A, Richomme P, Bruneton J. Les Chimanimines, Nouvelles Quinolines Substituées En 2, Isolées D'une Plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea longiflora*. J Nat Prod. 1993; 56 (9):1547-1552.

31. Muñoz MH, Mayrargue J, Fournet A, Gantier JC, Hocquemiller R, Moskowitz H. Synthesis of an antileishmanial alkaloid isolated from *Galipea longiflora* and of related compounds. Chem Pharm Bull. 1994; 42 (9): 1914-1916.

32. Fournet A, Ferreira ME, Rojas A, Torres S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. In Vivo Efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines in Experimental Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(11): 2447-2451.

33. Fournet A, Angelo A, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A, Bruneton J. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37 (4): 859-863.

34. Fournet A, Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Muñoz MH, Mayrargue J, Moskowitz H, Cavé A, Hocquemiller R. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania Donovan*. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 33: 537-544.

35. Bourdy, G.; DeWalt, S.J.; Chávez de Michel, L.R.; Roca, A.; Deharo, E.; Muñoz, V.; Balderrama, L.; Quenevo, C.; Giménez, A. "Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group" Journal of Ethnopharmacology, 2000 70, 87-109

36. Proyecto Multilateral OEA "Flora Regional como Fuente de Fármacos contra Parásitos, Hongos y Cáncer". Coordinador CIFLOPAN de Panamá y participación de Argentina, Bolivia, Colombia y Guatemala. 2001-2004.

37. Proyecto CYTED-X.5 “Búsqueda Obtención y evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios” Subprograma X, Química Fina Farmacéutica. 1999-2003.
38. SALAMANCA, Efrain; RUIZ, Grace; TICONA, Juan Carlos; GIMENEZ, Alberto “Método colorimétrico – XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad Leishmanicida.”. Biofarbo. 2008;16: 21-27.
39. CALLA-CARRASCO, Jacqueline; TROYE-BLOMBERG, M; FERNANDEZ, C., “El extracto de alcaloides de Galipea Longiflora (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro – inflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral e Interferón- y in vitro”, BIOFARBO, Vol XIV- Diciembre 2006. 34. J. Calla-Magarinos*, A. Giménez, M. Troye-Blomberg* & C. Fernández*. An Alkaloid Extract of Evanta, Traditionally Used as Anti-leishmania Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- γ Production in Polyclonally Activated Cells. CLINICAL IMMUNOLOGY. Journal compilation _ 2009 Blackwell Publishing Ltd. Scandinavian Journal of Immunology 69, 251–258.
40. Marianella Castes Inmunología de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana Instituto de Biomedicina, Cátedra de Inmunología, Escuela J.M. Vargas Félix J. Tapia Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.
41. Disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-leishmaniasis-cutanea/leishmaniasis-tratamiento>.
42. Delgado G, Parra-López CA, Vargas LE, Hoya R, Estupiñán M, Guzmán F, Torrez A, Alonso C, Velez ID, Spinel C, Patarroyo ME. 2003. Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during Leishmania (Viannia) panamensis infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs) Parasite Immunolog. 25:199-209.
43. Dra. Consuelo Macías Abraham, 1 Téc. Ninoska Robles, 2 Lic. Xiomara Palacios, 2 Ing. Consuelo Vega, 2 Dr. Alcides González Mairena 2 y Dr. José M. Ballester Santovenia RESPUESTA INMUNE CELULAR EN ENFERMOS CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA ATÍPICA
44. Rianed Velasquez Arias, Tesis te Post Grado. Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes con Leishmaniasis muco cutánea 2006

45. Imagen. Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas .Laboratorio de Investigación en Inmunología.

46.MTT Assay http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay.

