

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA



**"APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA EN EL DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN  
DE TRATAMIENTO CON GLUCANTIME EN  
PACIENTES CON LEISHMANIASIS DE LA  
LOCALIDAD DE RURRENABAQUE"**

**POSTULANTE: VIVIANA PERALTA CHAMBI**

**ASESORA: SUSANA REVOLLO *Ph. D.***

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**LA PAZ - BOLIVIA  
2007**



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA



**“APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA EN EL DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN  
DE TRATAMIENTO CON GLUCANTIME EN  
PACIENTES CON LEISHMANIASIS DE LA  
LOCALIDAD DE RURRENABAQUE”**

**POSTULANTE: VIVIANA PERALTA CHAMBI**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**LA PAZ - BOLIVIA  
2007**

Agradezco la colaboración de:

Susana Revollo PhD.

Lic. Irma Callisaya

Lic. Maria Esther Chuquimia

Biotec. Maria Luz Soto

Dr. Walter Toro

Biotec. Janeth Guerrero

A todo el personal del Hospital de  
Rurrenabaque.

Instituto SELADIS

Fundamentalmente la colaboración de los  
pacientes.

Agradezco a Dios por darme la fuerza  
para terminar este trabajo.

Agradezco a mi familia por apoyarme.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Enfermedades Infecciosas: "Nuevas Estrategias Terapéuticas" de ASDI - SAREC

## INDICE

I. Introducción.....	1
II. MARCO TEORICO .....	5
A. EPIDEMIOLOGÍA .....	5
1. Situación en el ámbito mundial.....	5
2. Situación epidemiológica en Bolivia.....	6
B. LEISHMANIASIS.....	7
1. Definición.....	7
2. Filogenia y taxonomía.....	8
3. Formas clínicas.....	10
4. Morfología y membrana. ....	10
5. Organización genómica.....	15
6. Ciclo biológico .....	19
7. Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad. ....	22
C. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD .....	26
1. Antimoniales pentavalentes. ....	27
1.1. Modo de acción.....	28
1.2. Farmacocinética .....	28
1.3 Eficacia.....	28
2. Anfotericina B. ....	29
3. Nuevas alternativas terapéuticas. ....	29
D. FENOMENOS DE RESISTENCIA .....	30

1. Amplificación génica. ....	30
2. Cambios estructurales en proteínas. ....	30
3. Modificación del transporte de fármacos. ....	31
4. Multirresistencia a fármacos.....	31
E. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	31
1. Leishmaniasis en Latinoamérica.....	32
2. Antecedentes en Bolivia.....	34
3. Formas clínicas importantes en Bolivia.....	35
F. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	36
1. Inmunofluorescencia indirecta.....	36
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	37
2.1. Componentes de la Reacción. ....	41
2.2. Condiciones de la reacción: .....	42
III. OBJETIVOS.....	43
A. Objetivo General.....	43
B. Objetivos específicos.....	43
IV. MATERIALES Y METODOS.....	44
A. DISEÑO.....	44
1. Tipo de estudio.....	44
2. Tipo de muestreo.....	44
B. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	44
C. La población.....	44

1. Criterios de inclusión.....	44
DIAGRAMA DE TRABAJO .....	45
D.TOMA DE MUESTRA .....	46
1. Lesiones cutáneas: .....	46
2. Sangre periférica.....	46
E. TECNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	46
1. FROTIS.....	46
1.1.LECTURA.....	47
2. INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.....	47
2.1. Procedimiento para el diagnóstico. ....	47
2.2. LECTURA.....	48
2.3. RESULTADOS:.....	49
3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	49
3.1. Extracción de ADN de cultivos.....	49
3.2. Extracción de ADN de muestras.....	49
3.3. Preparación del Master mix.....	50
3.4.Amplificacion .....	51
3.5. Análisis de la amplificación. ....	51
F. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO.....	52
1. PRIMERA EVALUACIÓN.....	52
2. SEGUNDA EVALUACIÓN.....	53
3. TERCERA EVALUACIÓN.....	53

V. RESULTADOS .....	53
A. FROTIS.....	53
B. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	54
C. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	54
D. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN EVALUADA A T1, T2 Y T3 MEDIANTE LA PCR. ....	55
E. EVALUACIONES DEL TRATAMIENTO.....	61
1. PRIMERA EVALUACIÓN.....	61
2. SEGUNDA EVALUACIÓN Y TERCERA EVALUACIÓN.....	64
VI. DISCUSIÓN.....	66
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. RECOMENDACIONES.....	76
IX. BIBLIOGRAFIA.....	77
ANEXOS	

## Resumen

Es de crucial importancia establecer un método de diagnóstico oportuno, lo cual incide en la selección del tratamiento adecuado. Al estudiar 90 muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de leishmaniasis del hospital de Rurrenabaque y de diferentes comunidades aledañas al pueblo. Con el frotis solo el 20%(18) de la población dio resultado positivo. Con la inmunofluorescencia indirecta se obtuvo que el 54% (49) de los pacientes dio positivo. En cuanto a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el 100% de los resultados para los 90 pacientes fue positivo. Para realizar la evaluación del tratamiento con glucantime se tomaron muestras de sangre en tres diferentes tiempos: al finalizar el tratamiento (T1), Al mes de finalizado el tratamiento (T2) y finalmente a los seis meses de finalizado el tratamiento (T3). Solamente 27 pacientes cumplieron las 3 evaluaciones, de los cuales el 92,59%(25) eran del género masculino y el 7%(2) pertenecían al género femenino. Comprendidos entre los 15 y 60 años de edad. El lugar de probable contagio que reportaron los pacientes fue el ingreso al monte con el 74%. Sobre las Formas Clínicas observadas, de los 27 pacientes, 23 pacientes (85.19%) presentaron la forma clínica de Leishmaniasis Cutánea pura (LC); 4 pacientes (14.81%) Leishmaniasis mucocutánea (LMC). Los agricultores con el 37% (10) resultaron ser el grupo más afectado. Al realizar el T1 con la PCR el 77.78% de los pacientes dio resultado negativo, a T2 el 88.88% de los pacientes dio resultado negativo, los mismos resultados se dieron a T3, con lo cual podríamos afirmar que se curaron. Las técnicas convencionales tienen menor sensibilidad y especificidad ante la PCR. Es así que el PCR es tomado en cuenta tanto para el diagnóstico como para la evaluación del tratamiento con glucantime.

## I. INTRODUCCIÓN

Los protozoos del género *Leishmania* causan un grupo de enfermedades denominadas Leishmaniasis, cuyo espectro va desde úlceras cutáneas que curan espontáneamente hasta graves afecciones viscerales que pueden comprometer la vida del paciente, existiendo entre estos dos polos una amplia gama de posibilidades clínicas. (Cáseres y col., 2002)

El organismo se transmite a los humanos por la picadura del mosquito. El hombre es un hospedero accidental y como hospederos naturales se incluyen roedores, pequeños mamíferos y perros. (Se consigue en: <http://antonionondonlugo.com/blog/?p=341> ;5 de febrero de 2007)

El incremento global de casos se debe a la penetración de colonos en la selva y medio rural, a la mala rotulación de barrios y viviendas en la periferia de grandes ciudades próximas a áreas de transmisión activa, a la transformación medioambiental que conlleva la alteración de la humedad y vegetación potenciando la aparición de reservorios e insectos involucrados en la leishmaniasis.

Al menos existen veinte especies patógenas de *Leishmania* que son transmitidas por la picadura de los flebótomos (clase Insecta, Orden Díptera); estos protozoos son, además, parásitos obligados de los macrófagos del hospedador vertebrado. Por tanto, animal parasitado, insecto vector y sujeto susceptible conforman la cadena epidemiológica. (Se consigue en: [http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34440&locale=es\\_ES&textOnly=false](http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34440&locale=es_ES&textOnly=false) , 05 de febrero de 2007)

La leishmaniasis representa un serio obstáculo para el desarrollo socioeconómico de 88 países, por lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido a esta enfermedad como un problema de salud pública global. Son 72 los países en vías de desarrollo afectados por esta enfermedad, entre ellos Bolivia. (Cáseres y col., 2002)

En Bolivia el año 2005 con sólo 1984 casos reportados la incidencia fue de 24.3 por cada 100.000 habitantes. Estos datos son preocupantes, ya que se pueden elevar con las continuas migraciones de la población, y no sólo eso sino que aparecen nuevas especies de *Leishmania* las cuales tienen diferentes características por lo cual causan la misma enfermedad pero en diferente grado, ya sea moderado severo o grave, y además su respuesta a los diferentes tratamientos. (Se consigue en:

<http://www.ops.org.bo/sociedad/rct/2006/20060801/presentaci%C3%B3n%20EO%20UPCE.pps#373> ; 5 de febrero 2007)

Actualmente, continúa siendo escasa la información epidemiológica de *L. chagasi* en Bolivia. Desde 1982 hasta 1999 se han aumentado el número de casos de Leishmaniasis visceral, la mayoría de los cuales procedían de zonas subtropicales de La Paz . Recientemente, en Chulumani y otras localidades de Nor y Sud Yungas de La Paz, se ha establecido coinfecciones mixtas tanto en humanos como en animales con la presencia de agentes de los complejos *L. V. braziliensis*, *L. L. mexicana* , *L. donovani/chagasi* así como de *T. cruzi* agente etiológico de la enfermedad de Chagas. (Se consigue en: <http://www.galenored.com/trabajos/archivos/129.pdf> ; 5 de febrero de 2007)

El método convencional para el diagnóstico de la leishmaniosis es la identificación del parásito en cultivo o por histopatología. Como alternativa,

se han desarrollado métodos inmunológicos como son la intradermoreacción de Montenegro, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) y el test de aglutinación directa (Gari-Toussaint M et al., 1994; Bhatia A. et al.,1999; Schallig HD.et al, 2001)

Numerosos intentos de diagnóstico fueron desarrollados con el fin de evitar procedimientos traumáticos y/o difíciles de realizar; de esta manera surgió el Test de Aglutinación Directa (DAT), el ELISA, el Inmunoblot y la inmunofluorescencia, que permitieron una alternativa rápida y menos costosa herramienta de diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, su baja sensibilidad y especificidad, han hecho que estos métodos sean limitados, causando que estas técnicas no sean muy confiables, debido a la presencia de falsos positivos y a las reacciones cruzadas con otras enfermedades como malaria, enfermedad de Chagas, Bartonelosis, entre otras.(Rajasekariah GH. Et al 2001)

Además, la limitación se hace evidente cuando la parasitemia en las muestras clínicas es baja, en pacientes inmunodeprimidos o cuando se trata de una Leishmaniasis cuya morfología es atípica.

En los últimos años, los avances en la Biología Molecular han abierto la posibilidad de desarrollar herramientas específicas para el diagnóstico de enfermedades. En este sentido, numerosas técnicas moleculares han sido reportadas para el diagnóstico y diferenciación de especies de *Leishmania*. Una de las más utilizadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la que constituye una técnica de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la leishmaniasis. ( Singh S. et al., 2003)

En Bolivia, los procedimientos de diagnóstico incluyen el frotis, el cultivo, la histopatología, la intradermoreacción de Montenegro o leishmanina, el ELISA y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI); todos ellos con elevadas limitaciones a nivel de sensibilidad y especificidad.(Mollinedo S. y col 2002 )

En áreas endémicas el diagnóstico de leishmaniasis es prácticamente basada en la presentación clínica, el teñido de biopsia y aspirado como métodos de confirmación y ocasionalmente mediante el uso de la prueba de Montenegro, este último, aunque es altamente sensible, no permite la discriminación de una infección reciente o antigua y de la cepa involucrada en la infección.

En las últimas dos décadas numerosas técnicas de detección basadas en la tecnología del ADN han mostrado ventajas sobre las técnicas convencionales. (Flores M. y col., 2004)

El uso de oligonucleótidos específicos para el ADN del minicírculo en el kinetoplasto (ADNk) por la técnica de la (PCR) ha superado a los procedimientos de detección parasitológica convencional convirtiéndose en una herramienta útil para el diagnóstico de esta enfermedad. (Harris Eva 1998)

En el presente trabajo se ha pretendido aplicar métodos moleculares para realizar el diagnóstico y evaluación del tratamiento con glucantime en los pacientes con leishmaniasis.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. EPIDEMIOLOGÍA

#### 1. Situación en el ámbito mundial

Las Leishmaniasis en sus diversas formas clínicas se presentan hoy en día cada vez mas expandidas y cobran mayor importancia en la Salud Pública del planeta. La OMS (1) indica que existen 81 países en el mundo con Leishmaniasis, con una población en riesgo de 350 millones de personas, teniendo anualmente aproximadamente 580.000 nuevos casos, con una prevalencia global de 12 millones de personas. El 90% de la Leishmaniasis visceral (LV) están en India y Sudan. (WHO/HQ. Geneva 1993)

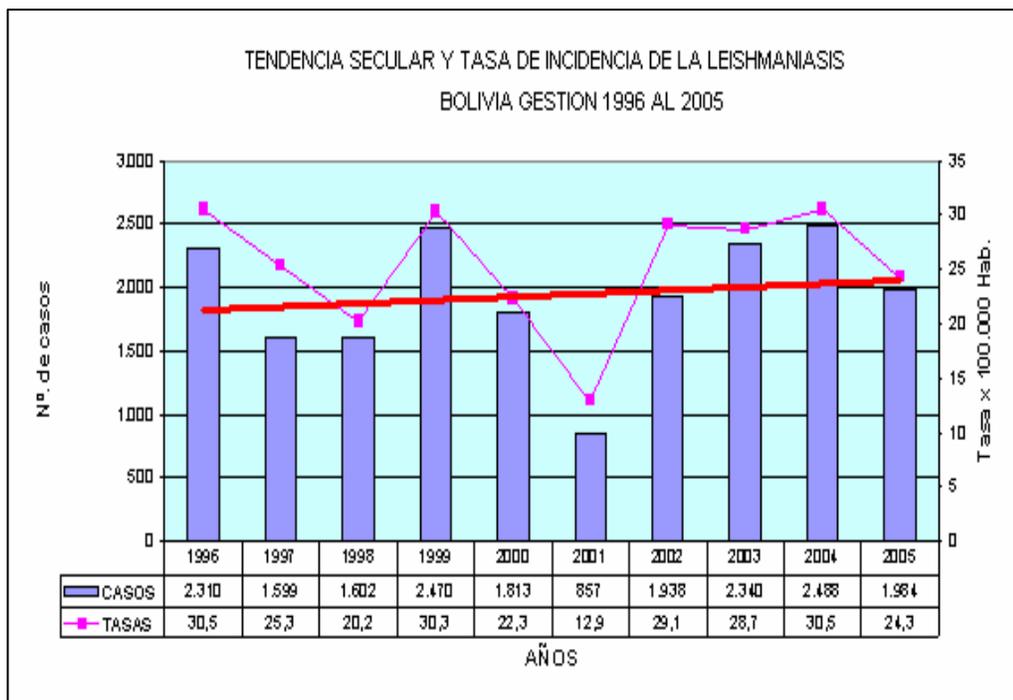
El 90% de Leishmaniasis cutánea (LC) se encuentran en Afganistán, Arabia Saudita, Argelia, Brasil, Irán, Irak, Siria y Sudan.

En la actualidad aproximadamente 12 millones de personas están afectadas por la leishmaniasis. Se estima que hay 2 millones de nuevos casos cada año, de los que sólo un 30% se declaran oficialmente. La forma más grave, la leishmaniasis visceral o Kala Azar, puede ser mortal. De las aproximadamente 500.000 personas afectadas cada año, el 100% morirán si no reciben tratamiento. El 90% de casos de Kala Azar tienen lugar en los países en vías de desarrollo: Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán. El Kala Azar también se encuentra en Europa. En los países del sur, a más de 1.400 personas seropositivas, de las cuales un 71% eran heroinómanos, se les diagnosticó Kala Azar en 1998. El tratamiento más común es el SSG comercializado con el nombre de Pentostam®. Un curso de tratamiento cuesta 150 dólares americanos, con lo que, en África, donde el SSG genérico

no está autorizado, la mayoría de las personas con Kala Azar no tienen acceso a tratamiento.( Croft et al 2002) (Alvar J et all,1997 )

## 2. Situación epidemiológica en Bolivia

La población en riesgo de enfermar, esta estimada en 800.00 habitantes repartidos en 7 departamentos de Bolivia, estos son: Pando, Beni, La Paz , Santa Cruz , Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. La situación epidemiológica en Bolivia se ha ido modificando , las tasas de incidencia muestran un comportamiento diferente a partir de 1995 y 1996 , manteniéndose estables en 1997 y 1998. En el 2000 existe una disminución en el número de casos por problemas de notificación.



Fuente: MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES (René Barrientos)

En el año 1999 la incidencia fue de 30,34, mientras que en el año 2000 con sólo 1735 casos reportados la incidencia fue de 22,94 por cada 100.000 habitantes, además el 68% de los casos corresponde al sexo masculino y el

32% al femenino. Un total de 1458 pertenecen a la forma cutánea equivalente al 84,94% y 227 casos a la forma mucosa lo que equivale al 15,92%.

La tasa más alta de incidencia se encuentra en el departamento de Pando, lo que supera 7 u 8 veces la de los departamentos de Beni y La Paz. Las tasas de incidencia en Santa Cruz y Tarija son relativamente menores a la de otros departamentos, aunque por ello no menos preocupantes. Dada la intensidad de la migración de la población en edad de trabajar, desde el altiplano a las tierras bajas, llama la atención el reducido número de casos notificados en Potosí. La afección aqueja mayormente a personas en edad productiva, sin embargo preocupar la ocurrencia de casos en menores de 1 a 4 y de 5 a 14 años, esto último sobre todo en el departamento de La Paz. (Sánchez A., 2000)

## **B. LEISHMANIASIS**

### **1. Definición**

Enfermedad polimorfa de la piel y de las mucosas causada por varios tipos de protozoarios pertenecientes a especies del género *Leishmania*; son parásitos extracelulares obligados en humanos y otros huéspedes mamíferos, transmitidos en América por la picadura de mosquitos *Lutzomia*. Existen diferentes especies de *Leishmania*: *L. donovani* es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral o Kala azar; *L. tropica* es la responsable de la Leishmaniasis cutánea de oriente, *L. brasiliensis*, responsable de la leishmaniasis mucocutánea y *L. mexicana* responsable de

Una forma muy peculiar de leishmaniasis cutánea que se limita casi en exclusiva al pabellón auricular o úlcera de los chicleros.

Estos parásitos fueron descritos por primera vez, de forma independiente, por William Leishman y Charles Donovan en 1903, pero habían sido observados por David. D. Cuningham en 1885 y por Meter Borovsky en 1898. Posteriormente, fueron clasificados en el Orden Protozoa y el género *Leishmania* por James Wright en 1903. (Vannier-Santos et al 2002)

## 2. Filogenia y taxonomía

Este protozoo flagelado está encuadrado en el Reino de los Protistas ingestadores como sigue (Levine et al., 1980):

**Reino:** PROTISTA Haeckel, 1866

**Subreino:** PROTOZOA Goldfuss, 1817

**Filo:** SARCOMASTIGOPHORA Honigberg-Balamuth, 1963

**Subfilo:** MASTIGOPHORA Deising, 1866

**Clase:** ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

**Orden:** KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963; modificado por Vickerman, 1976

**Suborden:** TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

**Familia:** TRYPANOSOMATIDAE Doeflein, 1901

**Género:** *Leishmania* Ross, 1903

**Subgénero:** *Leishmania* Safjanova, 1982

Dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector (Lainson et al., 1979;

1987): subgénero *Leishmania* (Saf'janova, 1982) con desarrollo suprapilórico de los flagelados y subgénero *Viannia* (Lainson and Shaw, 1987) de multiplicación peripilórica. En la Figura 1 se muestra un esquema con la taxonomía actualizada del género *Leishmania*.

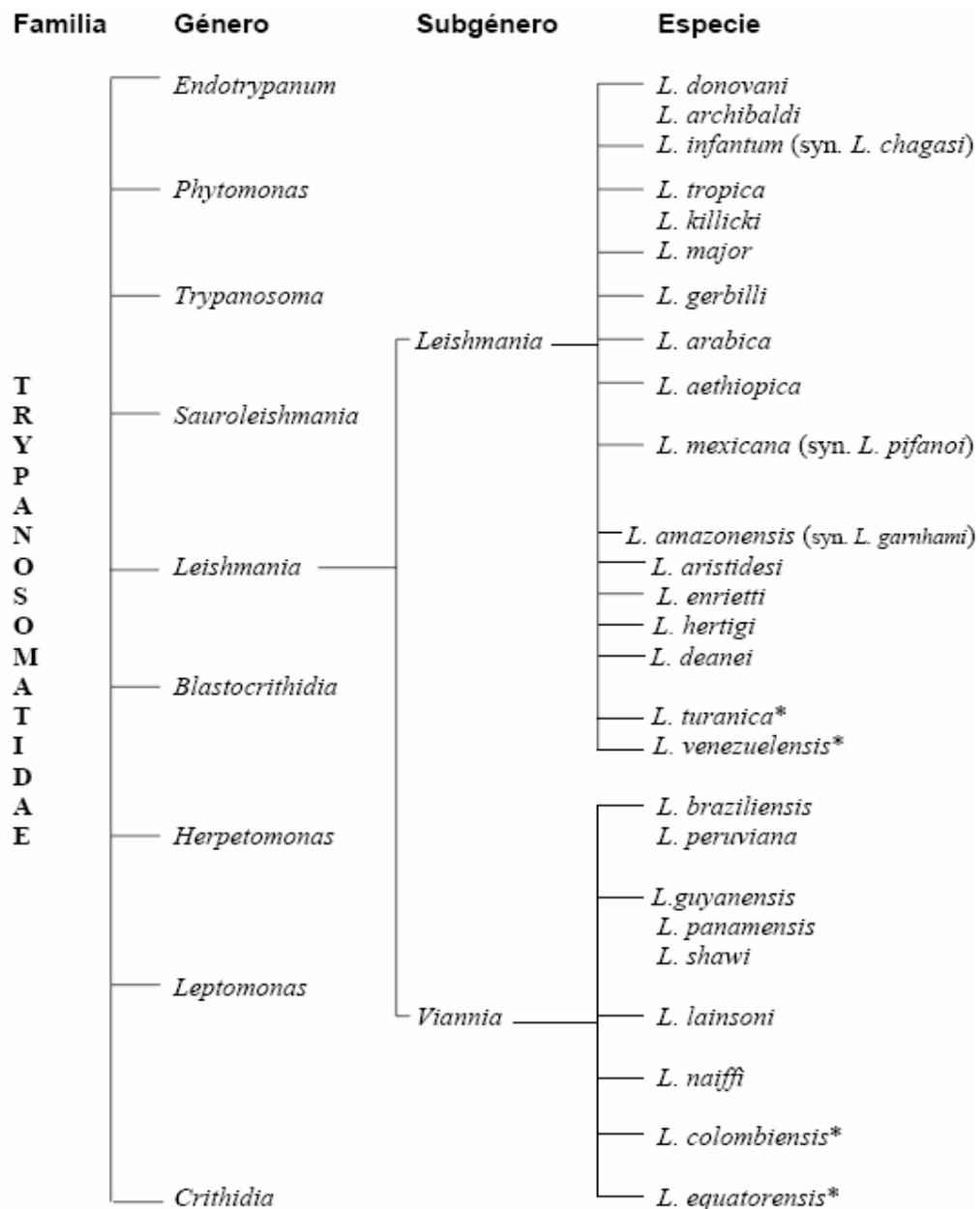


Figura 1. Clasificación del género *Leishmania*, basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica. (Rioux et al., 1990)

### 3. Formas clínicas(Alvar Jp., 2001; Connor DH et al 1997; Alvar E. 2000):

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria con una amplia gama de síntomas clínicos: cutáneo, mucocutáneo y visceral.

**El leishmaniasis visceral** - también conocido como kala azar - es caracterizado por combates irregulares de la fiebre, de la pérdida substancial del peso, de hincharse del bazo y del hígado, y de la anemia (de vez en cuando seria). Si está dejada untreated, la tarifa de fatalidad puede ser tan alta como 100%.

**En formas mucocutáneas de leishmaniasis**, las lesiones pueden conducir a la destrucción parcial o total de las membranas del mucose de la nariz, de las cavidades de la boca y de la garganta y de los tejidos finos circundantes. Este las formas que inhabilitan y que degradan de leishmaniasis pueden dar lugar a las víctimas que son humilladas y echar hacia fuera de sociedad.

**Las formas cutáneas** de la enfermedad producen normalmente úlceras de la piel en las partes expuestas del cuerpo tales como la cara, los brazos y las piernas. La enfermedad puede producir una gran cantidad de lesiones - a veces hasta 200 - que causan inhabilidad seria e invariable que salen del paciente marcado con una cicatriz permanentemente.

### 4. Morfología y membrana:

Implicado en el anclaje del parásito al macrófago y a las microvellosidades intestinales del insecto, y en la inhibición de la respuesta oxidativa y la producción de óxido nítrico por parte del macrófago (Turco y Descoteaux, 1992). En el promastigote está presente en un número muy alto de copias,

entre 1 y 1.5 millones por célula, sin embargo, en el amastigote es muy poco abundante.

Además de los orgánulos comunes a otros eucariotas, *Leishmania* posee ciertas particularidades que le diferencian. Debajo de la membrana citoplasmática encontramos una red de microtúbulos subpeliculares siguiendo una trayectoria helicoidal con respecto al eje longitudinal de la célula. Esta red de microtúbulos se extiende por todo el cuerpo celular dejando libre la porción correspondiente a la bolsa flagelar, donde quedan confinados los procesos de endo- y exocitosis. Esta red proporciona una morfología estable y cierta movilidad contráctil. El glucosoma es un orgánulo único en los Kinetoplastida que alberga las enzimas de las primeras etapas de la glucólisis y guarda semejanzas con los peroxisomas y glioxisomas de los eucariotas (Oppenheimer y Michels, 1993). El megasoma es un orgánulo lisosomal muy voluminoso que contiene, entre otras enzimas típicas de lisosomas, una alta proporción de cisteín-proteasas asociadas a la capacidad invasiva de los amastigotes del complejo mexicana (McKerrow et al., 1993).

Se acepta de forma general que la multiplicación de *Leishmania* es asexual (agamogonia). Se realiza por bipartición longitudinal de los promastigotes, excepto en las formas metacíclicas que no se dividen. Primero lo hace el núcleo, luego el corpúsculo basal, a continuación se forma el flagelo para finalmente dividirse el citoplasma. Los amastigotes se dividen bien por bipartición o bien por división múltiple.

Varias son las características morfológicas y fisiológicas de *Leishmania*. Tanto el promastigote (en cualquiera de sus formas) como el amastigote son

células bien organizadas, con una membrana citoplásmica en cuya superficie se dispone el glucocálix o cubierta de gluconjugados que actúa como interfase entre el parásito y el medio externo en el que se encuentre (tubo digestivo del flebotomo o vacuola parasitófora del macrófago), gluconjugados que son clave para la supervivencia del parásito. En la bolsa flagelar hay una mayor concentración de moléculas propias del glucocálix.

Debajo de la membrana se disponen en espiral los microtúbulos subpeliculares que confieren una morfología relativamente estable y cierto movimiento contráctil. La membrana celular del promastigote se invagina en una bolsa para alojar al flagelo, constituido por nueve pares de microtúbulos periféricos y uno central, siendo sus componentes principales la actina y tubulina. Este flagelo, de unas 20 mm de longitud, se encastra en la matriz celular el corpúsculo basal que es un conjunto de microtúbulos. El flagelo establece contacto con la membrana de la bolsa flagelar mediante hemidesmosomas.

El núcleo está formado por una doble membrana en cuyo interior se hallan el nucleolo y la cromatina, condensada en histonas. En el citoplasma se encuentran los retículos endoplásmico liso y rugoso en conexión con el núcleo, y los ribosomas formando cadenas arrosariadas independientes de los retículos. El aparato de Golgi está compuesto por media docena de sacos en conexión con unas vacuolas; además hay lisosomas, vacuolas lisas, enzimas metabólicos, cuerpos amorfos, gránulos de iones de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{++}$  y  $Zn^{++}$  y acantosomas. En los amastigotes y en los promastigotes más evolucionados, sobre todo los metacíclicos, aparece un orgánulo lisosomal voluminoso llamado megasoma, cargado con una serie de cisteín proteinasas, enzimas

proteolíticas de 18 a 31 kilodaltons, asociadas con la capacidad invasiva *L. mexicana*. En la proximidad del corpúsculo basal se encuentra el kinetoplasto, estructura rica en ADN que pertenece a la única y gran mitocondria celular existente. El cuerpo celular tiene unas 15  $\mu\text{m}$  de longitud.

Las leishmanias se alimentan heterotróficamente. El metabolismo de los carbohidratos es incompleto hasta ácidos orgánicos y  $\text{CO}_2$  mediante fermentación aerobia por glucólisis y por la ruta de las pentosas fosfato. La glucosa es utilizada como fuente energética: el azúcar es acumulado gracias a un sistema de proteínas transportadoras a través de la membrana, pero también por un sistema que incorpora la glucosa citoplasmática dentro del glucosoma, organela donde suceden las primeras etapas de la glucólisis<sup>70</sup>. El aporte energético más importante se hace, sin embargo, a partir de los carbonos de los aminoácidos. En lo que se refiere a los ácidos nucleicos, las leishmanias no son capaces de sintetizar de novo las purinas aunque sí las pirimidinas; entre los metabolitos más importantes se encuentran las putrescinas y espermidinas. De forma general se acepta la multiplicación asexual (agamogonia) en *Leishmania*, la cual se realiza por bipartición longitudinal de los promastigotes, con excepción de las formas metacíclicas que no se dividen: primero el núcleo, luego el corpúsculo basal, después se forma el flagelo y finalmente el soma. Los amastigotes pueden dividirse bien por bipartición o por división múltiple.

La membrana celular es una bicapa lipídica convencional, pero en su superficie se han identificado una serie de moléculas relacionadas con la capacidad invasiva del parásito; estas propiedades se resumen en la Tabla 1

Las más abundantes, la glicoproteína de 63 kilodaltons (gp<sup>63</sup>) y el lipofosfoglicano (LPG), se anclan a la membrana del protozoo mediante una estructura glicosil-fosfatidil-inositol (revisado en109) y a los macrófagos por receptores, favoreciendo la penetración de *Leishmania*. Este sistema de anclaje es de extraordinaria importancia en la biología de *Leishmania*. ( se consigue en: [http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34437&locale=es\\_ES&textOnly=false](http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34437&locale=es_ES&textOnly=false): 5 de febrero de 2007)

**Tabla 1. Moléculas principales de la membrana de *Leishmania* y propiedades.**

MOLECULA	FUNCIONES	REFERENCIA
<b>gp63</b>	500.000 copias por promastigote y anclaje GPI	
	Polimórfica y conservada entre las especies de <i>Leishmania</i> .	14,34,35,88
	Es una metaloenzima con acción proteasa	15,24,36
	Aparece en promastigotes y amastigotes pero en éstos en el lisosoma.	29,40,44,88
	Fijación a los linfocitos CD4+ humanos para interferir la inducción de la respuesta inmune.	55
	Defensa frente a los enzimas proteolíticos del flebotomo	
	Penetración en el macrófago directamente o por el receptor C3.	3,18,21,129
	Protección dentro de la vacuola parasitófora frente a los enzimas lisosomales del macrófago.	132
	Regulada por tres clases de genes según se trate de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico, estacionario o amastigotes.	67,88,110,111,131,132
<b>gp46</b>	Mayoritaria y anclaje GPI	108
	Presente en el subgénero <i>Leishmania</i> pero ausente en <i>Viannia</i>	54,86
	Resistente a la degradación proteolítica en el macrófago	60,76

## ...Continuación de la tabla 1

<b>LPG</b>	5 millones de copias en el promastigote, muy poco abundante en el amastigote. Enlace GPI.	61,82,83,96,137
	Resistencia a la degradación por las hidrolasas lisosomales en el flebotomo y en el macrófago.	60,69
	Se deposita en el extremo flagelar para anclarse a los microvilli intestinales del insecto.	25,69,98
	Protección del promastigote frente al complemento C5b-9.	97,102
	Fija la fracción C3b del complemento en la superficie del parásito para reconocer receptores CR3 y CR1.	46,61,101
	Inhibe respuesta oxidativa del macrófago.	42
	Inhibe producción de óxido nítrico en el macrófago.	26
	Protección de las hidrolasas lisosomales del macrófago.	53,82,87
	Metacicloogénesis mediante incorporación o pérdida de azúcares	19,84,11
<b>Fosfolípidos de glucosilinositol</b>		
	Varios millones de copias y anclaje GPI	83
	¿ Papel en la invasión del macrófago ?	117
	¿ Precursores del LPG ?	117
	¿ Anclajes de otras moléculas ?	
	Inhibidores de inducción de NO	

## 5. Organización genómica

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida poseen un ADN genómico (ADNg) localizado en tres compartimentos: en el núcleo, como ADN cromosómico, en la mitocondria o kinetoplasto, formando una red de maxicírculos y minicírculos (ADNk) (Simpson et al., 1980) que se replica independientemente y es inusual en la naturaleza, y en el citoplasma como ADN extracromosómico. El ADNk es rico en A+T (72-73%) a diferencia del ADN cromosómico, rico en G+C (>60%) (Álvarez et al., 1994).

El material genético de los protozoos del orden Kinetoplastida está organizado en cromosomas que, al no condensarse en ninguna fase del ciclo mitótico, no pueden ser visualizados con el microscopio óptico, lo que impide su análisis citogenético convencional. La introducción de la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) ha permitido obtener un patrón del cariotipo de *Leishmania*, pero es extremadamente polimórfico y complejo.

En general, se acepta que *Leishmania* posee un genoma constituido por 20-36 cromosomas con un tamaño de 150 kilobases en los minicromosomas y de 4 megabases en los de mayor tamaño (Van der Ploeg et al., 1984).

**Cromosomas.** El patrón del cariotipo de *Leishmania* obtenido mediante electroforesis de campo pulsado es difícil de estudiar por ser extremadamente polimórfico, hasta el punto que es casi específico de cepa. Ciertos cromosomas no homólogos pueden migrar conjuntamente como una misma banda y, al contrario, cromosomas homólogos pueden aparecer como dos bandas, por lo que el número exacto de cromosomas no es bien conocido. Quizás se puede deber a que un aislamiento es, en realidad, una estructura en mosaico y cuando se realiza el estudio del cariotipo se parte de 107-108 promastigotes, por lo que el patrón de bandas de una electroforesis sería resultado de los cariotipos de los diferentes clones existentes en cada aislamiento (Bastien P y cols., 1990).

Para unos autores la haploidía es la norma en *Leishmania*, con algunas cepas poco comunes que presentan diploidía e, incluso, aneuploidía. Para otros, la estructura es típicamente diploide, con dos juegos de cromosomas idénticos

lo que supondría un intercambio de material entre dos células, es decir algo cercano a la sexualidad (Bastien P y cols, 1990).

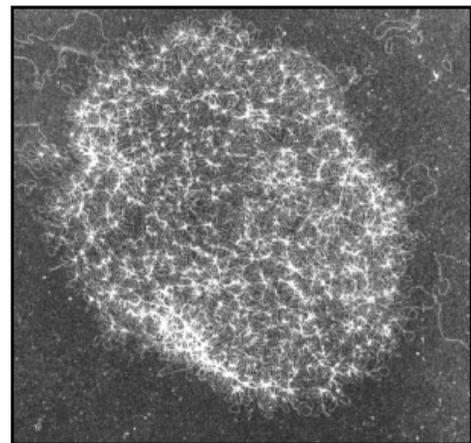
Aunque no ha sido posible determinar con certeza el carácter diploide del genoma de *Leishmania*, en general existe un consenso sobre ello, además de aceptar que es funcionalmente asexual (Wong, 1995). El kinetoplasto se encuentra dentro de la membrana mitocondrial y está presente en todos los protozoos del orden Kinetoplastida (Barker y Arnot, 1981). Es un disco visible al microscopio óptico con un diámetro de 1-2  $\mu\text{m}$ . Contiene aproximadamente 107 pares de bases.

Situado dentro de la membrana mitocondrial, en la base del flagelo, y aparece en todos los kinetoplastidos. Representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red de moléculas circulares (maxicírculos y minicírculos) concatenadas covalentemente (Simpson, 1979) (Figura 2).

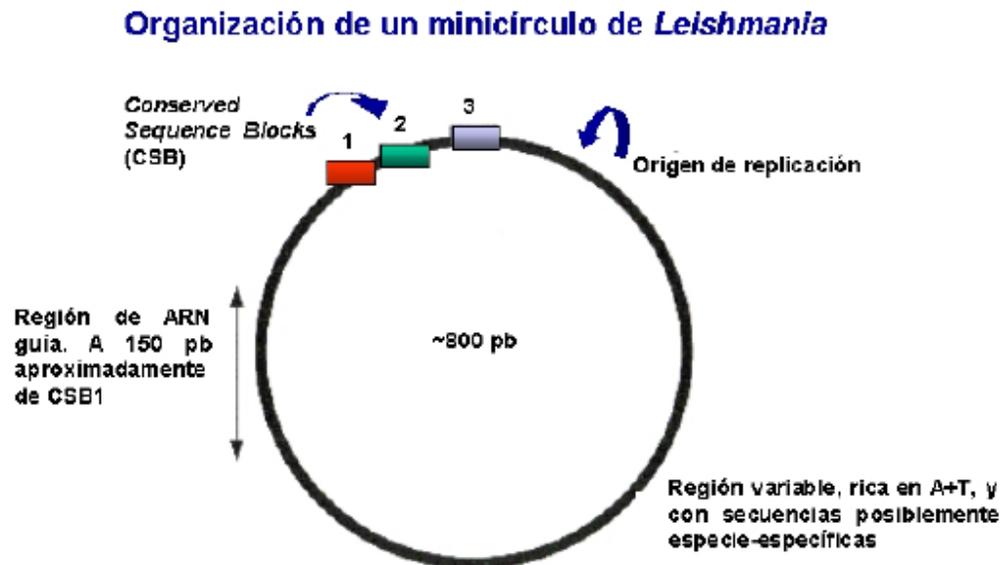
El ADNk contiene unos 50 maxicírculos (30-40 kilobases), que contienen los genes que codifican el ARN ribosomal y algunas proteínas mitocondriales (Benne et al., 1983).

De 10.000 a 20.000 minicírculos, con un tamaño que oscila entre 400 y 2500 pares de bases, dependiendo de la especie.

**Figura 2.** Microscopía electrónica del ADNk de *Leishmania*.



En cada minicírculo existe una región muy conservada de unos 120 pares de bases y una región variable de unos 700 pares de bases. Poseen los ARN guías, y forman parte de la estructura y la división del kinetoplasto (Arts y Benne, 1996) (Figura3).



**Figura 3. Esquema básico de la organización general de un minicírculo de *Leishmania*.**

Recientemente ha sido descrito un marco abierto de lectura (ORF) en la región variable de una familia de minicírculos de *Leishmania donovani*. La proteína codificada presenta homología con proteínas transportadoras de membrana conocidas, TAP-1 y TAP-2 (Singh y Rastogi, 1999). En *Leishmania* existen entre 8 y 20 familias de minicírculos que presentan una serie de secuencias con un tamaño que oscila entre las 300 y las 600 pares de bases y que están altamente repetidas (CSB, Conserved Sequence Blocks), conocidas como CSB1, 2 y 3. Las leishmanias presentan un número limitado

de familias de secuencias, cuyo número, entre 10 y 80, depende de la especie (Brewster y Barker, 2002), y algunas de las familias, entre 4 o 5, acaparan casi el 80% de los minicírculos. Esto significa que una gran cantidad de copias (más de 3.000) de unas pocas secuencias de entre 300-600 pares de bases estarán disponibles para estudios de secuenciación y diseño de cebadores (Desjeux et al., 2001). Las secuencias de los minicírculos pueden variar por mutación o recombinación con otras cadenas de minicírculos ya existentes, lo que se traduce en una variabilidad relativamente alta (Rogers y Wirth, 1988). Sin embargo, se ha comprobado la homogeneidad y estabilidad de ciertas secuencias de minicírculos, pertenecientes a una misma clase, de leishmanias geográficamente muy distantes, así como dentro de la misma especie (Lambson et al., 1999; 2000).

## **6. Ciclo biológico**

Leishmania es un parásito digénico, es decir, realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (numerosas especies del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) en forma flagelar o promastigote, (Figura 4), y otra parte en el hospedador vertebrado (gran variedad de géneros) principalmente en los macrófagos, en forma aflagelar o amastigote (Figura 4).

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

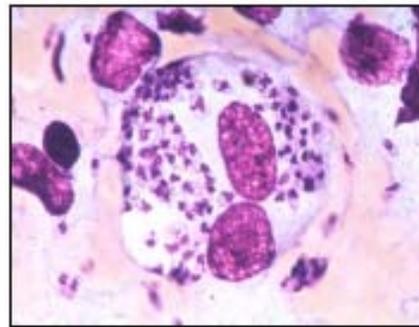
Una vez que el parásito se encuentra en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, se produce una fagocitosis por parte del macrófago, que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de

eliminarlo, mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, entre otros el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas lisosomales vertidas en el interior de la vacuola parasitófora.

Leishmania evade estas reacciones inespecíficas del macrófago para sobrevivir y multiplicarse en su interior.



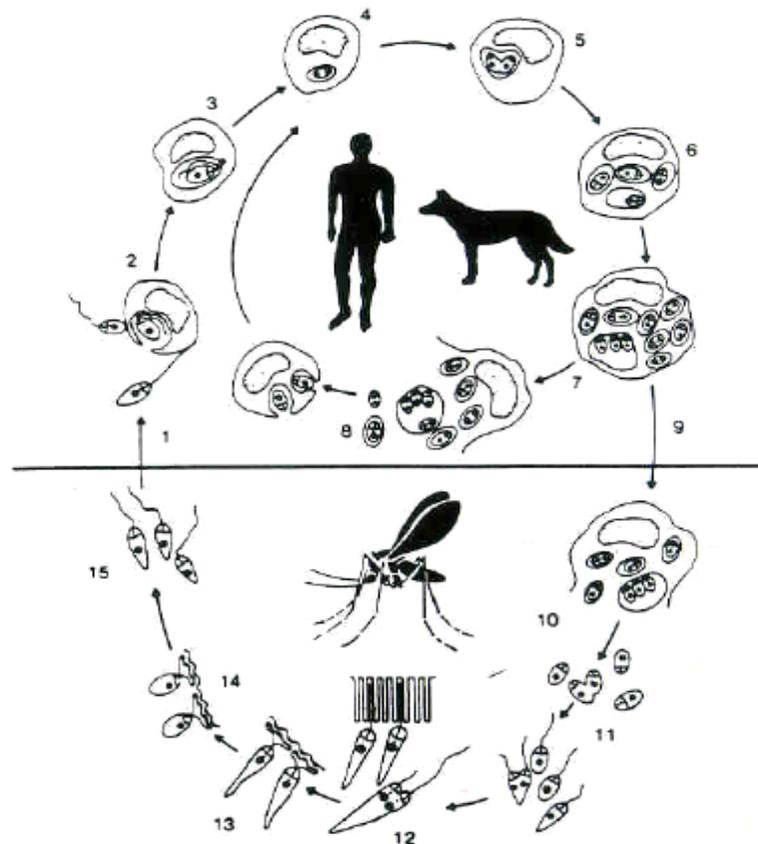
**Figura 4.** Formas promastigote. Tinción de Giemsa de un cultivo de leishmanias. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)



**Figura 5 .** Formas amastigote. Tinción de Giemsa de un frotis de una biopsia esplénica. [www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)

La progresión de la enfermedad dependerá de si los amastigotes sobreviven a estas reacciones por parte de los macrófagos, de la virulencia del protozoo y de la eficacia de la respuesta inmune. Las células parasitadas circulantes pueden ser ingurgitadas por otros flebotomos, en cuyo aparato digestivo se liberan los amastigotes, para transformarse posteriormente en promastigotes. Pasados varios días alcanzan la capacidad infectiva (metaciclogénesis); en este momento las leishmanias se encuentran ya en la probóscide del flebotomo, pudiendo ser inoculadas a otro hospedador vertebrado, cerrándose así el ciclo (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).

En la **Figura 6** se muestra un esquema detallado del ciclo biológico (modificado de Chang et al., 1985)



**Figura 6. Ciclo de Leishmania en los hospedadores vertebrado e invertebrado**

1.- Promastigotes en capilares sanguíneos después de la picadura del flebotomo. 2.- Fijación y fagocitación de los promastigotes en un macrófago. 3.- Fusión del fagosoma y lisosoma. 4.- Diferenciación del promastigote en amastigote. 5.- Multiplicación del amastigote en la vacuola parasitófora. 6.- Multiplicación intravacuolar de amastigotes. 7.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes. 8.- Fagocitosis de amastigotes libres por otros macrófagos. 9.- Ingestión de macrófagos parasitados cuando el flebotomo

ingurgita sangre. 10.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes en el tracto digestivo del flebotomo. 11.- Multiplicación de amastigotes y diferenciación en promastigotes. 12.- Multiplicación de promastigotes e inserción de flagelos entre los microvilli del endotelio digestivo. 13.- Multiplicación en región pilórica e íleo con flagelos fijándose en la pared. 14.- Promastigotes con los flagelos unidos a la cutícula del intestino anterior. 15.- Promastigotes infectivos libres en la probóscide.

## **7. Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad**

Últimamente se ha ido sugiriendo la posibilidad de que durante el ciclo biológico de muchos protozoos parásitos, puede tener lugar un intercambio genético. Las dos consecuencias genéticas fundamentales de la reproducción sexual son segregación y recombinación; su ausencia en poblaciones naturales indicaría la inexistencia por tanto de este tipo de reproducción. Se ha podido demostrar que *Leishmania* sufre recombinación genética en el laboratorio y en poblaciones naturales (Rioux y Lanotte , 1990; Kelly et al., 1991). Sin embargo todos los intentos de cruzamiento experimental en el vector han fracasado (Panton et al., 1991). A principios de los 90 se propuso una teoría general de reproducción clonal para los protozoos parásitos (Tibayrenc et al., 1990; 1991). Se postula que una especie es clonal cuando sus descendientes son idénticos a los progenitores. Esta teoría clonal no contradice la aparición de recombinación genética en poblaciones naturales del parásito, simplemente que éstas no son lo suficientemente frecuentes para romper los patrones de prevalencia de la estructura de la población clonal. Es más, estudios de segregación genética en cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes coinfectados por el VIH, sugieren que en estos pacientes el

parásito también sigue un patrón clonal, con las implicaciones epidemiológicas que de ello se derivan (Jiménez et al., 1997).

Si la reproducción fuera asexual o mitótica, se produciría una elevada divergencia en los cariotipos con líneas clonales uniparenterales donde las células hijas serían idénticas entre ellas. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que, en cada especie, el cariotipo está representado por un grupo reducido de cromosomas altamente conservado y un juego amplio de cromosomas variables, únicos para cada aislado (Giannini SH y cols., 1990). Para explicar el esquema de propagación en función de la haploidía, se ha propuesto la teoría clonal. En este sentido se considera que una especie es clonal cuando los descendientes son idénticos a los progenitores, serían como fotocopias. En el caso concreto de *Leishmania*, existirían clones importantes y clones menores, dependiendo de su dominancia. La clonalidad no implica la ausencia de recombinaciones genéticas en poblaciones naturales del parásito, sino que éstas no son suficientemente frecuentes para romper la estructura de la población clonal. Si, por el contrario, hubiera reproducción sexual, se favorecería la unión entre grupos de cromosomas en los individuos de una población y, por tanto, existiría una conservación global del cariotipo.

Durante los diez últimos años se ha ido sugiriendo la segunda hipótesis, con la idea de que durante el ciclo biológico de muchos protozoos parásitos puede tener lugar intercambio genético. Los ejemplos de recombinación más significativos se describen a continuación. En Arabia Saudí se aislaron dos cepas, de un roedor del desierto y de un perro doméstico, que se consideraron híbridos naturales de *L. major* y *L. arabica* mediante estudios de isoenzimas y análisis de la organización genómica. Ambas coexisten en la

misma zona y comparten un único vector, *Phlebotomus papatasi*, lo que permitiría amplias oportunidades de asociación entre las dos especies. Algo similar se ha detectado en el valle andino de Huanuco (Perú), un nicho ecológico cerrado, donde se ha demostrado la existencia de híbridos de *L. peruviana* y *L. braziliensis* mediante tipificación isoenzimática, cariotipos y RAPD (ver apartados III.1 y III.2). Algunos autores han filmado en el laboratorio la formación de híbridos (sincariontes) entre *L. infantum* y *L. tropica*. Sin embargo, los intentos de formar híbridos cruzando aislados en el vector en definitiva, donde se podrían entrecruzar las cepas en la naturaleza han fracasado siempre.

Toda esta discusión no es puramente académica pues la recombinación genética podría tener implicaciones médicas y taxonómicas, como es la transferencia de la resistencia a fármacos, cambios en la patogenia e incluso podría alterar el concepto de especie.

ADN circular extracromosómico y mini cromosomas. En el genoma de *Leishmania*, además de su dotación cromosómica, se han identificado elementos genéticos circulares de 30 a 200 kilobases que contienen múltiples copias de los genes que codifican los enzimas desdobladores de ciertos fármacos. Estos elementos son resultado de un proceso de amplificación del genoma a partir de un cromosoma fuente. Se originan como respuesta a la presión ejercida por ciertos medicamentos, frente a los que se desarrollan resistencias tal y como sucede con los plásmidos bacterianos. En *Leishmania* existen, además, los mini cromosomas que también son amplificaciones génicas pero no como consecuencia de la presión medicamentosa sino como resultado de replicación autónoma espontánea;

estas moléculas pertenecen a una familia de genes asociados con la regulación del crecimiento celular.

Kinetoplasto. Es una estructura que poseen los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida, dentro de la membrana mitocondrial y de carácter inusual en la naturaleza. Está constituido por un disco visible al microscopio óptico que contiene 107 pares de bases de ADN mitocondrial o ADNk.

El ADNk representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red gigante de miles de moléculas circulares, maxicírculos y minicírculos, concatenadas covalentemente. Su proceso de replicación ha sido motivo de varias revisiones.

El ADNk contiene unos 50 maxicírculos de 30 a 40 kilobases los cuales poseen una región conservada y otra variable. Se les atribuye la misma función que al ADN mitocondrial de otros sistemas celulares como es contener los genes que codifican los ARN ribosomales y algunas proteínas de la mitocondria.

Los minicírculos son las moléculas más pequeñas del ADNk, con un tamaño que oscila entre 450 y 2500 pares de bases dependiendo de la especie. Tienen los ARN guías, implicados en la corrección de ARNm codificados por los maxicírculos y, por supuesto, esos minicírculos forman parte de la estructura y replicación del propio ADNk. El ADNk contiene de 10.000 a 20.000 minicírculos los cuales poseen una secuencia variable en el 80% de su longitud y unos 120 pares de bases conservados. Las distintas especies de *Leishmania* agrupan de ocho a veinte familias de minicírculos, de acuerdo a su tamaño.

Una misma cepa puede permanecer inalterable mientras que las secuencias de los minicírculos pueden cambiar por mutación o recombinación con otras cadenas de minicírculos ya existentes lo que, finalmente, deriva en una gran variabilidad de los mismos y contribuye a la evolución rápida del ADNk. Los minicírculos del ADNk transcriben ARN guías, encargados de la maduración de los ARN primarios, primer eslabón en la adaptación del protozoo a los distintos medios en los que ha de vivir en sus distintas versiones morfológicas y con los requerimientos fisiológicos de cada fase. Este proceso postranscripcional es conocido como edición de ARN o RNA. (Se consigue en: [http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34437&locale=es\\_ES&textOnly=false](http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34437&locale=es_ES&textOnly=false), 5 de febrero de 2007)

### **C. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD**

La utilización de medicamentos para combatir la leishmaniasis se remonta a la antigüedad ya se usaba tartrato emético en Egipto en inyección intravenosa contra tripanosomiasis africana (1908); Viania en 1912, utiliza el antimonio en pacientes con leishmaniasis cutaneo mucosa. Escomel en 1917 utiliza el oxido de antimonio para el tratamiento de la forma visceral, en la actualidad se han fabricado una gama importante de medicamentos, sales orgánicas pentavalentes sobre todos los derivados de antimonio. (Mollinedo y colaboradores 2002)

El tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se lleva a cabo con los mismos fármacos, tales como los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y la pentamidina, aunque la posología y la vía de administración difiere según los casos. La toxicidad asociada a estos

fármacos leishmanicidas de uso común, junto con la aparición de fenómenos de resistencia a los mismos, ha originado la necesidad de obtener nuevos fármacos de diverso origen, como alternativa terapéutica. (Yuri A. , et al 2006)

### 1. Antimoniales pentavalentes.

Son los compuestos de primera elección y los más extensamente usados en la terapéutica de la enfermedad desde hace 40 años. El grupo consta de dos formas comerciales: Pentostam® (estibogluconato sódico) y Glucantime® (antimoniato de meglumina). El principal efecto es un descenso en los niveles de ATP del parásito, debido a la alteración de la glucólisis y de la oxidación de ácidos. La dosis de fármaco empleada depende del contenido en antimonio (Sb) de éste. La O.M.S. recomendó en 1982 la administración de 20 mg/Kg/día de Sb por vía venosa, con un máximo al día de 850 mg de Sb; sin embargo, la baja acumulación del fármaco en la piel, puede ocasionar variación en la posología. (Yuri A. , et al 2006)

Ciertos fármacos como la pentamidina interactúan directamente con el ADNk, interfiriendo en su replicación y transcripción, además de modificar su conformación estructural, es decir, la red concatenada sufre modificaciones apreciables (Basselin et al., 1998). El significado de estos cambios no está perfectamente claro, pero se ha propuesto el término "transkinetoplastidia", para explicar cómo ante la presencia de ciertos fármacos (pentamidina, arsénicos y tunicamicina), se produce un cambio en la replicación de los minicírculos, que conduce a que las familias minoritarias, tras varios ciclos de replicación, sean las mayoritarias (Yuri A., et al 2006).

### **1.1. Modo de acción**

Los antimoniales pentavalentes inoculados en el paciente para poder ejercer su acción tienen que convertirse en trivalentes en el interior de los macrófagos; estos antimoniales trivalentes reaccionan con los grupos sulfhidrilos del parásito dando como resultado la inhibición de la glucólisis y la oxidación de sus ácidos grasos, con lo que se reduce la formación de energía(ATP).(Mollinedo y colaboradores 2002)

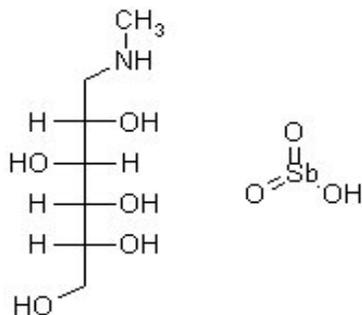
### **1.2. Farmacocinética**

Los antimoniales pentavalentes se absorben bien por vía intramuscular (VIM) a razón de 10mg/L en 1 ó 2 horas. El medicamento se elimina en forma rápida pero incompleta por vía renal (orina), una pequeña fracción de antimoniales trivalentes permanecen en el cuerpo por un lapso medio de 3 días, y existe la posibilidad de que queden concentraciones residuales. (Mollinedo y colaboradores 2002)

### **1.3. Eficacia**

El glucantime en términos generales es más eficaz mientras más precoz sea el tratamiento; en las lesiones primarias a nivel cutáneo se tienen altos índices de respuesta adecuada, aunque suele existir porcentaje bajo (5-10%) ineficacia probada que se manifiestan como recidivas o reactivaciones, este porcentaje posiblemente esta en aumento.

Ante la eventualidad de una recidiva o reactivación o en el caso de úlcera secundaria (a nivel mucoso) se recomienda la utilización de anfotericina B.(Mollinedo y colaboradores)



### Formula estructural del glucantime

#### 2. Anfotericina B.

Es el fármaco de segunda elección después de los antimoniales pentavalentes. Se trata de un antibiótico macrocíclico de bajo espectro derivado de *Streptomyces nodosus*, cuyo modo de acción se basa en su unión al ergosterol de la membrana del parásito, produciendo alteraciones en la permeabilidad de la misma con pérdida de metabolitos (Ramos et al., 1994). Sus efectos colaterales adversos en el paciente han hecho de la anfotericina B un fármaco empleado principalmente en casos de leishmaniasis visceral recidivante y en áreas de alta resistencia a antimoniales. No obstante, en los últimos años se han desarrollado nuevas formulaciones del compuesto conjugado con lípidos, lo que ha mejorado su índice terapéutico, además de una disminución significativa de los efectos tóxicos en humanos. Estas moléculas lipídicas engloban edicamentos y liberan su contenido de manera retardada.

#### 3. Nuevas alternativas terapéuticas.

El desarrollo en los últimos años de líneas de investigación orientadas a la obtención de nuevos compuestos con valor terapéutico frente a la

leishmaniasis, se ve justificado ante la creciente aparición de problemas asociados al tratamiento clásico de la enfermedad. Entre éstos destaca la aparición de fenómenos de resistencia frente a los medicamentos tradicionales (Borst y Ouellette, 1995) seguido de la toxicidad asociada a los fármacos, la tolerancia a los mismos por parte del paciente dependiendo de su estado físico, la falta de un diagnóstico precoz que impida el aumento de la carga parasitaria.

#### **D. FENÓMENOS DE RESISTENCIA**

- 1. Amplificación génica.** En presencia del agente terapéutico se produce la amplificación de los genes codificantes de las proteínas blanco del fármaco, con la consiguiente sobreexpresión de proteína; pero también aparecen amplificadas regiones del ADN no relacionadas de forma directa con dichas proteínas, tales como la región H, amplificada en casos de resistencia frente a fármacos no relacionados estructural ni funcionalmente (Beverley, 1991). Los casos de amplificación génica más estudiados son aquellos implicados en la resistencia al metotrexato (MTX), potente inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS). En los estudios realizados en *L. major*, se produce la amplificación de una región de ADN, denominada región R, que contiene el gen estructural de la DHFR-TS, con sobreexpresión de la enzima (Beverley, 1991).
- 2. Cambios estructurales en proteínas.** Otra de las vías para evadir la acción del fármaco consiste en la modificación de la proteína blanco sustituyendo los aminoácidos situados en el lugar de unión al compuesto

(Berman et al., 1989). En la cepa de *L. major* D7BR1000, resistente al metotrexato, el cambio de la base 158 del gen de la DHFR-TS, resulta en la sustitución de una metionina por una arginina en la posición 58 de la enzima, lo que impide la unión del MTX a la proteína, esencial para la inhibición (Arrebola et al., 1994).

- 3. Modificación del transporte de fármacos.** En muchos casos la resistencia viene dada por una entrada reducida del fármaco en el interior de la célula. Dicha reducción es consecuencia de un cambio producido en los transportadores de membrana del mismo (Basselin et al., 1997; Chiquero et al., 1998), tal es el caso de la cepa MTXA5 de *L. donovani* resistente a MTX, cuyo transportador de folatos presenta una actividad deficiente comparándolo con el de la cepa salvaje (Kaur et al., 1988).
- 4. Multirresistencia a fármacos.** En células tumorales multirresistentes se produce la sobreexpresión de una proteína de membrana de unos 170 kDa denominada glucoproteína P, que en un proceso dependiente de ATP expulsa el fármaco (Borst et al., 1995). Del mismo modo, en *Leishmania* también se produce una sobreexpresión de una glucoproteína P (150-180 kDa), encargada del transporte al exterior del compuesto citotóxico en un proceso dependiente de ATP (Sánchez et al., 1994).

## **E. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

La distribución geográfica de las leishmaniasis es cosmopolita. Así por ejemplo, *L. tropica* y *L. tropica* najor, causante del botón de Oriente, se encuentra en África ecuatorial, occidental y del norte; en Asia se le observa

en Rusia, Indostán y Medio Oriente; en Europa en las costas y en las islas del Mediterráneo (Italia, España, Grecia, Bulgaria y Rumania).

La leishmaniasis cutánea localizada, cuyo agente etiológico es *L. mexicana* y varias subespecies, se encuentra en el sureste de México, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán, Jalisco y Nayarit, así como en Centro América y algunos países de Sur América. La Leishmaniasis cutánea diseminada o anérgica que es una variante de *L. mexicana*, se distribuye en los mismos sitios en que se encuentra ésta, pero en México principalmente en Tabasco y Campeche.

*Leishmania brasiliensis* y sus subespecies causantes de la leishmaniasis mucocutánea o espundia, se localiza en países de Suramérica, Centroamérica y Sureste de México, principalmente en Tabasco y Quintana Roo. *L. peruviana* que se agrupa en el complejo anterior y es causante de la Uta, se le observa en las áridas vertientes de los andes peruanos y mesetas argentinas.

*L. donovani* con sus diferentes subespecies, se encuentra en países de la cuenca del Mediterráneo, África, algunas regiones de Asia y en América. *L. donovani chagasi* se localiza principalmente en Brasil, Venezuela, Colombia, El Salvador, Guatemala y en México en la región de la cuenca del río Balsas.

(se consigue en:

<http://www.drscope.com/privados/pac/generales/parasitologia/leishmaniasis.html>

;5 de febrero de 2007)

### **1. Leishmaniasis en Latinoamérica**

La leishmaniasis cutánea se presenta desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de la Argentina. Canadá, Chile y Uruguay. La mayoría de las islas de I Caribe están exentas de la enfermedad.

En las Américas existen 13 especies de *Leishmania* que afectan al hombre y que pueden manifestarse en tres formas clínicas diferentes.

Los agentes etiológicos de la leishmaniasis cutánea simple, incluyen todas las leishmaniasis aisladas del ser humano, hasta *Leishmania chagasi*.

Los agentes etiológicos de la leishmaniasis mucocutánea (LMC), también llamada espundia, son la *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis*, pero en el caso del primero la frecuencia y gravedad es mayor.

En el Brasil la forma cutánea y mucocutánea están muy difundidas, en 24 de los 26 estados se han registrado casos de leishmaniasis cutánea. Los agentes etiológicos son: *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, así como algunas nuevas especies, *L. lainsoni*, *L. maiffi* y *L. shawi*. En Colombia se notificaron casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, se estima el aumento del número de casos atribuible a actividades de detección y al establecimiento de nuevos asentamientos humanos en zonas, sobre todo en la amazonía, llanuras orientales y la costa del Atlántico. En el valle del río Magdalena y río Cauca entre 1981 y 1986 se notificaron más de 9.300 casos; en los años 1991 y 1992 se notificaron 10.313 casos con la tasa de prevalencia de 13,05 y 17,33 por 100.000 habitantes, respectivamente. La *L. braziliensis* es la más difundida, los vectores presentes en Colombia son: *Lu. Olmea bicolor* y *Lu. Flaviscutellata*.

En el Ecuador 17 de las 21 provincias presentan leishmaniasis hasta una altitud de 2.400 m.s.n.m.. Formas mucocutáneas se han encontrado en la región amazónica. Entre 1983 y 1986 se registraron 4.100 casos, 3.000 casos en 1990. Se han identificado 47 especies de flebótomos, las especies

antropofílicas infectadas naturalmente por leishmaniasis son : Lu. Trapidoi, Lu. hartmani y Lu. gomezi.

La forma UTA con lesiones en la cara especialmente en niños se presenta en las laderas occidentales de los andes y valles interandinos entre 900 y 3.000 m.s.n.m. Vectores potenciales son: Lu. Verrucarum, Lu. ayacuchensis y Lu. osornoi.

En el Perú la leishmanis andina (UTA) y la selvática (ESPUNDIA) son las dos formas que pertenecen al género Viannia. El año 1990 se han notificado 5.500 casos (22% a leishmaniasis andina y 78% a leishmaniasis selvática).

La transmisión humana se relaciona directamente con las actividades ocupacionales en el bosque, donde existe mucho contacto entre el hombre y el vector , los casos se están incrementando debido a los nuevos asentamientos en tierras bajas.(Sanchez B. Alejandro)

## **2. Antecedentes en Bolivia**

La leishmaniasis en Bolivia se encuentra distribuida geográficamente en el área rural de las zonas tropicales y subtropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz , Cochabamba , Tarija y Chuquisaca. En sus diferentes formas esta muy difundida entre los 270 a 2.400 m.s.n.m. en Bolivia. Los nuevos focos activos se hallan ubicados en las tierras tropicales bajas (nuevos asentamientos humanos), donde existe contacto estrecho entre el hombre y el bosque (explotación de madera), esta migración inclusive ha hecho que la transmisión se vuelva intradomiciliaria. (Sánchez A. 2000)

### 3. Formas clínicas importantes en Bolivia

Leishmaniasis Visceral (LV): En 1.982, se encontró un niño de 2 años, natural de Sur Yungas en el que se demostró un caso típico de Kala-azar (DESJEUX P. et al 1.983). Posteriormente hasta la fecha han podido demostrar una decena de otros casos similares; habiendo definido que la LV epidemiológicamente es de tipo esporádica, en nichos geográficos, teniendo como agente etiológico a la *Leishmania donovani* chagasi es transmitida por un insecto vector de hábitos doméstico y peridomésticos, más abundante en época seca, de actividad albo-crepuscular, zoophilica y antropophilica moderada, con tasas de infección entre 0,19 a 0,67 (LE PONT Francois, 1990), el *Lutzomyia longipalpis*; el reservorio doméstico demostrado es el perro.

Consideramos que existen muchos otros casos que no se detectan por falta de motivación de los Profesionales en Salud y que la mayoría de los casos son sub-clínicos o asintomáticos.

*Leishmania Cutánea Difusa* (LCD): Descrita por primera vez en nuestro país por Prado Barrientos en 1.948 (MOLLINEDO Sergio & cols. 1998); hasta la actualidad se han podido demostrar escasos casos en dos Departamentos (Santa Cruz y La Paz); El agente etiológico de esta enfermedad es del complejo mexicana la *Leishmania mexicana amazonensis*, el reservorio encontrado es un roedor *Oryzomys capito* (URJEL & cardozo. 1996), el insecto vector *Lutzomyia flaviscutellata* (MOLLINEDO Sergio & cols. 1998).

Leishmania Cutánea simple (LC): Habitualmente confundida con la Úlcera Primaria de la LCM, esta difundida en el Norte del país, tiene como agente a una o dos especies por definir de Leishmania mexicana; a la fecha se investigan los reservorios; los hallazgos de los posibles vectores muestran que se tratan de especies clásicas que presentan alguna pequeña modificación que les podría elevar al rango de especificidad, dentro estas tenemos al *Lutzomyia nuneztovari*, *L. Intermedia*, *L. Migonei*, *L. shawi*, (LE PONT Francois; 1990).

Leishmania Cutáneo mucosa (LCM): Conocida desde la antigüedad por el Imperio Incaico con el nombre de ESPUNDIA; es una zoonosis producida por la *Leishmania vianna braziliensis*, los reservorios selváticos demostrados en otros países son el perezosos, oso hormiguero, marsupiales y Roedores. Los insectos vectores comprobados en Bolivia son: *Psychodopygus yucumensis*, capturada en las zonas andinas bajas (Alto Beni y Yapacani), se encuentran en la selva y es el hombre que con su actividad va hacia el vector; *Ps. llanosmartinsi* y *Ps. Carrerai carrerai*, con agresividad diurna, influenciada por factores meteorológicos (lluvia) especie vectoriz en Alto Beni (LE PONT Francois; 1990).

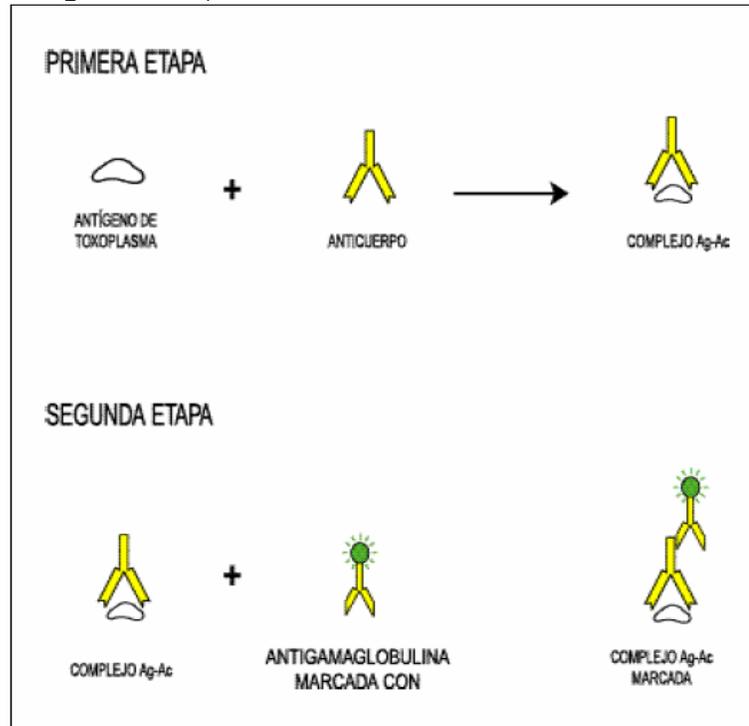
## F. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### 1. Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta, emplea como antígeno promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis*, *Leishmania mexicana amazonensis* y *Leishmania donovani chagasi* fijados en láminas, sobre la que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo. La formación de este complejo es

evidenciada por una anti gamaglobulina humana marcada con fluoresceína. (Sanchez, Naquira, Vega, 2002). (Figura 7)

Figura 7. Etapas de la inmunofluorescencia indirecta



## 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De forma paralela al desarrollo de sondas de ADN, se describió un método que solucionaba el problema de la baja sensibilidad en las hibridaciones, denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1986). Al comienzo se usaba una Taq DNA polimerasa, enzima termoestable aislada de una bacteria termófila *Thermus aquaticus*, con la que es posible amplificar un fragmento de ADN hasta obtener millones de copias del mismo. También se emplean otras polimerasas como la Tth, aislada de *Thermus thermophilus*. En la reacción de PCR, se repiten unos 30 ciclos con la siguiente secuencia: a) desnaturalización de la doble hebra de ADN a 94°C; b) unión de

oligonucleótidos específicos (cebadores) y diseñados complementariamente en los extremos del fragmento de ADN que queremos amplificar.

Es una técnica sencilla, sensible y específica, y permite la detección del parásito en todo tipo de muestras biológicas, en flebotomos y en cultivos.

La DNA Polimerasa lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria de DNA en la dirección 5' - 3' teniendo como molde una molécula de ADN de cadena sencilla, pero comenzando de una región de doble cadena, esta es la primera reacción de extensión (Figura. 8) y es la base fundamental de las técnicas de marcaje y secuenciación. (Rodríguez 2006)

La reacción en cadena de la Polimerasa utiliza este mismo principio, pero utiliza dos primers, cada uno complementario a la cadena opuesta de la región de ADN, la cual ha sido desnaturalizada por calentamiento. Los primers se arreglan de tal manera que la reacción de extensión de cada primer dirija la síntesis de ADN hacia el otro primer, esto es el primer "A" dirige la síntesis de una cadena de ADN, la cual puede entonces ser el blanco del primer "B" y viceversa. El resultado es la síntesis de una nueva cadena de ADN cuyos extremos son los dos primers (Fig. 8).

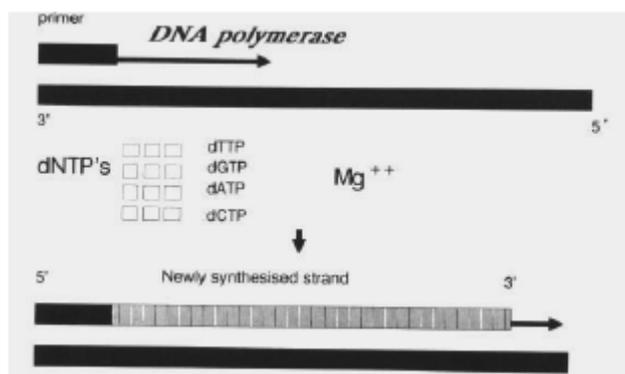


Figura 8.- Extensión del "primer". La ADN Polimerasa extiende el "primer", utilizando una cadena complementaria como blanco.

Los requerimientos de la reacción son bastante sencillos esto es: deoxinucleotidos para suministrar energía y nucleosidos para la síntesis de ADN, la enzima DNA Polimerasa, los primers, el ADN blanco y el buffer conteniendo magnesio que es esencial para la actividad de la enzima. Los deoxinucleótidos y los primers están siempre presentes en exceso de tal manera que los pasos para la síntesis puedan ser repetidos por calentamiento de la nueva cadena de ADN sintetizada para separar las cadenas y luego enfriar para permitir la alineación de los primers a su secuencia complementaria , con cada ciclo de calentamiento y enfriamiento, la cantidad de ADN en la región flanqueada por cada primer puede incrementarse exponencialmente, después de varios ciclos el producto de reacción predominante será aquel fragmento de ADN entre los dos primers, incluido por supuesto ambos primers.

Los ciclos de calentamiento y enfriamiento pueden ser repetidos y el ADN puede continuar acumulándose exponencialmente hasta que uno de los productos de la reacción se halla consumido o que la enzima sea incapaz de sintetizar un nuevo ADN suficientemente rápido. Si se utilizan altas concentraciones de ADN, este puede servir como primer al iniciarse la reacción y el resultado seria la síntesis de productos inespecíficos. El número de ciclos requeridos para una optima amplificación varia dependiendo de la cantidad de material en el comienzo de la reacción y de la eficiencia de cada paso de amplificación.

Generalmente 20-35 ciclos puede ser suficiente para producir 100ng a 1ug de ADN de cadena sencilla partiendo de 50ng de ADN genómico. Un paso final de incubación a la temperatura de extensión, la cual es generalmente

72°C resulta en una amplificación total de moléculas de doble cadena de todas las moléculas sintetizadas. Quizás el hecho más sorprendente de la PCR es la estabilidad de los componentes de la reacción a la elevada temperatura de desnaturalización (normalmente 95°C). Originalmente se utilizó la Klenow Polimerasa, pero debía ser adicionada después de cada paso de desnaturalización, posteriormente fue reemplazada por la enzima termoestable Taq-Polimerasa, lo cual permitió la automatización de la PCR. (Rodríguez 2006)

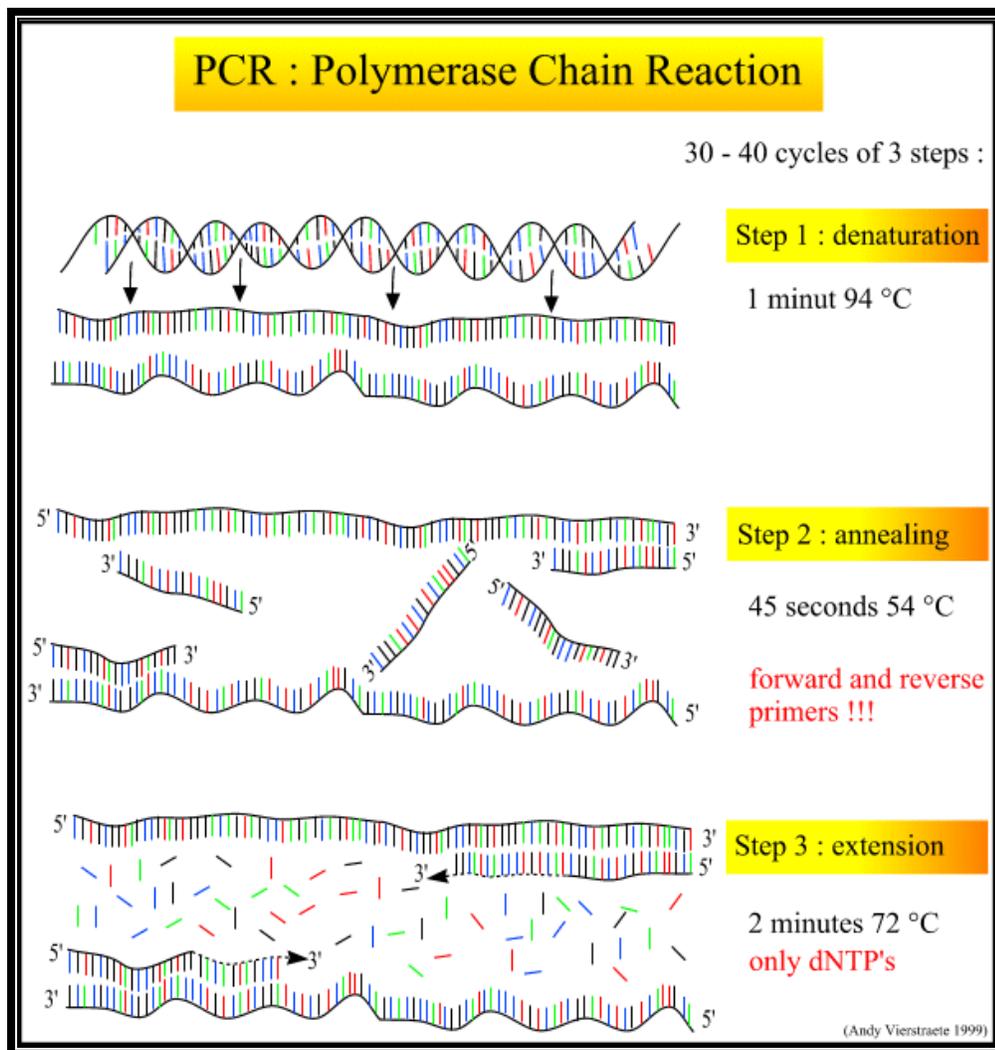


Figura 9.- Reacción en cadena de polimerasa. Pasos de la PCR  
(Se consigue en: [users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html](http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html) ; 5 de febrero 2007)

### 1.1. Componentes de la Reacción.

**DNA Polimerasa.** La más comúnmente utilizada es la Taq Polimerasa aislada de *Thermophilus aquaticus*, tiene la ventaja de ser estable a altas temperaturas. Debido a que la actividad de la Taq Polimerasa se duplica entre 65 - 72 grados, la temperatura del ensayo es sumamente importante. La actividad de la Taq Polimerasa es óptima en un rango de pH entre 8,2 - 9 en 10mM Tris, pero disminuye a altos o bajos pH.

**Deoxinucleotidos trifosfatos.** Los precursores o dNTPs pueden ser obtenidos liofilizados o en solución acuosa neutralizados. Son estables a -20°C por algunos meses en cuanto a configuración, pero cuando se obtienen liofilizados pueden requerir neutralización con KOH antes de usarlos. Cuando los dNTPs se disuelven a una concentración de 100mM, se pueden alicuotar en pequeños volúmenes de 50 ul de 20 mM cada dNTPs y guardarlos a -20 grados por varios meses.

**Buffer de Reacción.** Se pueden obtener varias formulas para el buffer de reacción, sin embargo una de las más recomendadas es la que contiene: Tris a una concentración final de 10mM (pH 8,4), 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% BSA, 0.01% NP40 y 0.01% Tween 20. El NP40 puede ser reemplazado por 0.1% Triton X-100, pero el detergente es esencial para obtener el máximo procesamiento de la enzima. Si se utilizan altas concentraciones de dNTPs puede ser necesario incrementar la concentración de Mg<sup>2+</sup>.

**Primers o iniciadores:** Los primers son generalmente sintetizados en el rango de 18-30 bases. La secuencia de los primers debe tener un contenido similar de G + C, mínima estructura secundaria y no ser complementario uno con otro particularmente en la región 3'.

**ADN blanco.** Los mayores requerimientos es que debe estar intacto en el fragmento que se quiere amplificar , esto puede significar que solo fragmentos cortos se pueden amplificar de muestras de ADN degradadas, es también importante asegurarse que trazas de detergentes, fenol o EDTA no están presentes. En algunos casos se puede recuperar un PCR negativo haciendo una dilución del ADN blanco presumiblemente porque los inhibidores presentes en la muestra también pueden diluirse. Es esencial asegurarse de la total desnaturalización del ADN antes de comenzar la PCR, usualmente se calienta a 95°C durante 5 minutos y la Taq. Polimerasa debe adicionarse después de este paso de desnaturalización. (Rodríguez 2006)

## **2.2. Condiciones de la reacción:**

La selección del tiempo, temperaturas y numero de ciclos depende del ADN que va a ser amplificado y de la selección de los primers, Los volúmenes de la reacción varían entre 10-100ul. La concentración de los primers es generalmente entre 25-100 pico moles para 50 µl de reacción. Los tiempos de incubación deben ser tan cortos como sea posible para reducir el riesgo de amplificación inespecífica. Tiempos de denaturacion y alineación de 30 segundos son adecuados y tiempos de extensión que permitan 1 minuto por Kb de ADN blanco, seguido de un tiempo final de extensión que permita 2 minutos por Kb es mas que suficiente. El número de ciclos requeridos depende de la abundancia del ADN blanco y de la eficiencia del PCR. (Harris,E.et al 1995,)

### III. OBJETIVOS

#### A. OBJETIVO GENERAL

- ◆ Aplicar la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico y evaluación de tratamiento con glucantime en pacientes con leishmaniasis de la localidad de Rurrenabaque

#### B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Realizar el diagnóstico de la leishmaniasis por métodos convencionales en pacientes de la localidad de Rurrenabaque con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis.
- ◆ Determinar la presencia de *Leishmania spp.* a través de la amplificación de ADN en raspados, infiltrados de lesiones, sangre total de pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis.
- ◆ Realizar el seguimiento del tratamiento con glucantime al finalizar el tratamiento al mes del y a los seis meses de finalizado el tratamiento.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. DISEÑO**

#### **1. Tipo de estudio**

Según la clasificación es cuasiexperimental.

#### **2. Tipo de muestreo**

Es un muestreo determinístico o de conveniencia.

### **B. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

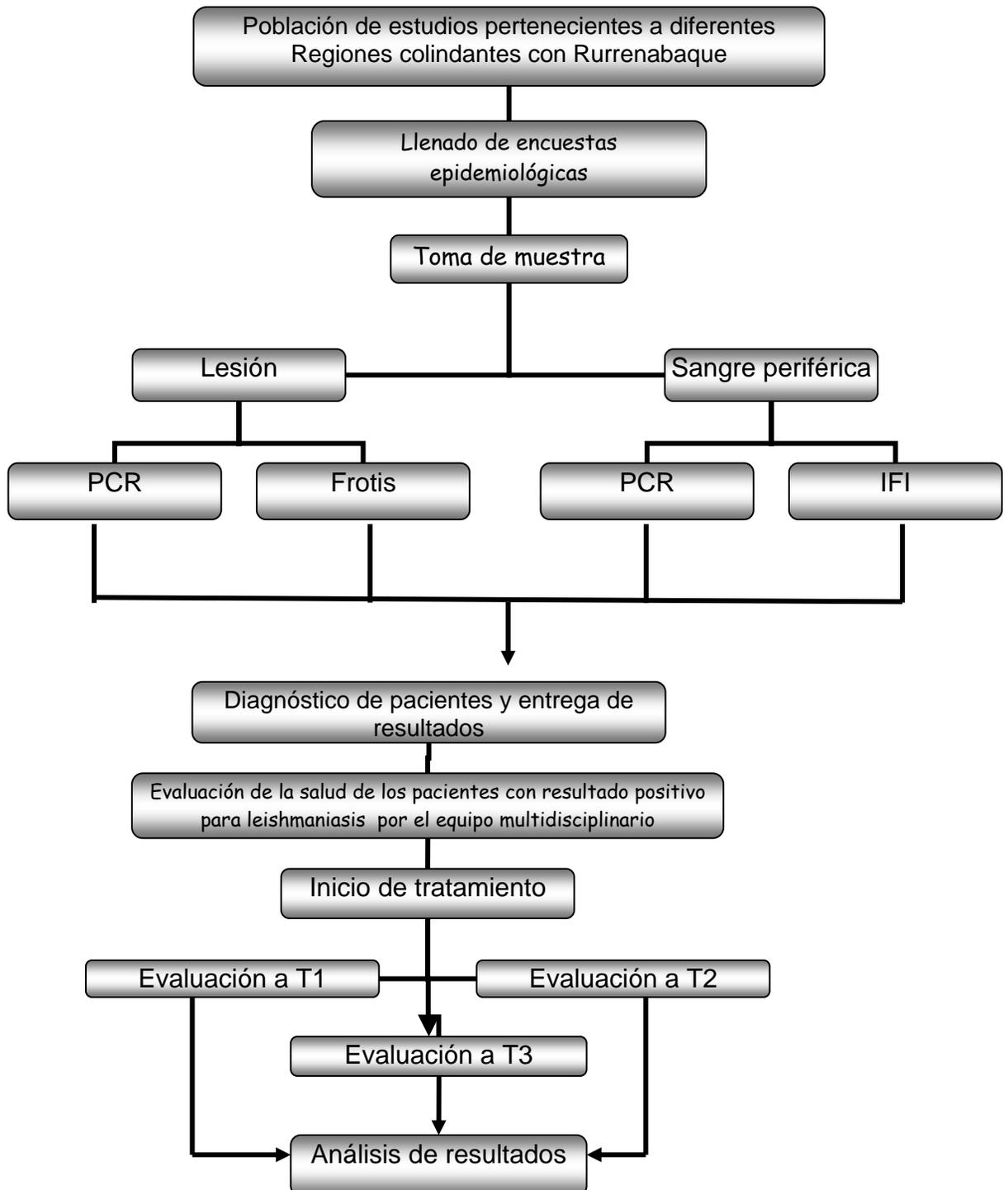
Rurrenabaque pertenece a la provincia Gral. J. Ballivián del departamento del Beni y aproximadamente cuenta con 5.000 habitantes. Además el clima tropical húmedo lo cual convierte a Rurrenabaque en una zona con un alta incidencia de leishmaniasis.

### **C. POBLACIÓN**

La población estuvo constituida por pobladores de Rurrenabaque y sus alrededores, que se presentaron al Hospital de Rurrenabaque con diagnóstico presuntivo de leishmaniasis, durante julio de 2005 hasta junio de 2006. A los cuales se les realizó el diagnóstico por métodos convencionales y PCR, posterior evaluación de médica, tratamiento y evaluación de post-tratamiento mediante la PCR. También se les hizo una encuesta epidemiológica. (ANEXO 1)

#### **1. Criterios de inclusión:**

- Pacientes comprendidos entre las edades 17 a 65 años de ambos sexos.
- Pacientes con diagnóstico por frotis positivo, diagnóstico Inmunológico positivo y/o diagnóstico molecular positivo.
- En el caso de pacientes mujeres, que no estén embarazadas.
- Pacientes sin daño renal, hepático para no agravar su salud por las contraindicaciones del medicamento.

**DIAGRAMA DE TRABAJO**

## D. TOMA DE MUESTRA

### 1. Lesiones cutáneas:

La obtención de las muestras fue realizada a partir de lesiones activas de la piel o mucosas. En las típicas lesiones ulceradas, ésta se realizó en los bordes de la lesión o en el fondo de la úlcera, después de realizar previo aseo del área afectada.

Esta toma de muestras puede realizarse por varios métodos: mediante un simple raspado de la lesión, (efectuando incisiones de algunos milímetros hasta alcanzar la dermis y efectuar un raspado), y colocarlo suavemente sobre un portaobjetos rotulado para realizar el frotis y en tubo ependorf ,con 500 ul de solución fisiológica o buffer TE 1X ,otra muestra para realizar el PCR(Harris Eva, 1998)

### 2. Sangre periférica

Se tomaron las muestras de sangre de acuerdo a las normas establecidas, posteriormente se coloca un volumen de sangre en un tubo vacutainer sin anticoagulante para separa el suero y realizar la inmunofluorescencia indirecta. Para la PCR se alícuota en un tubo vacutainer 2,5 ml de Guanidina (6M)-EDTA(200mM) y añadir el mismo volumen de sangre y mezclar por inversión.(Harris Eva, 1998)

## E. TECNICAS DE DIAGNÓSTICO

### 1. Frotis

Se preparo una extensión delgada como para examen hematológico de forma circular y luego se dejo secar la extensión para fijarla con metanol durante 1 minuto.

Posteriormente se tiñen las láminas, con coloración Giemsa (dilución 1:10), durante 30 minutos.

### 1.1. Lectura

Se coloca una gota de aceite de inmersión a las láminas para observar al microscopio con el aumento de 100 X. Para así reportarse el resultado como positivo según el índice de puntuación.

(+) Menos de un parásito por campo a 100x inmersión examinando un mínimo de 100 campos

(++) De 2 a 10 amastigotes/campo en un mínimo de 50 campos

(+++) De 11 a 20 amastigotes/campo en un mínimo de 50 campos

(++++) De 21 amastigotes o más por cada campo, en un mínimo de 10 campos

## 2. Inmunofluorescencia indirecta

Elaboración de las improntas: Para la preparación del antígeno, se utilizaron promastigotes de cultivos en medio Schneider suplementado con suero fetal bovino al 20% y gentamicina 200ug/ml. Los parásitos fueron colectados por centrifugación de los cultivos y fijados enteros en portaobjetos con círculos de aproximadamente 0,5 cm apropiados para la reacción y dejarlas secar, las cepas utilizadas fueron : *L. amazonensis* PH8 *L. braziliensis* M 2903 Y *L. donovani* PP75, finalmente se las guardo a -20°C.

### 2.1. Procedimiento para el diagnóstico:

Siguiendo el esquema de distribución de sueros, se añadió en las áreas circulares de la lámina IFI lo siguiente:

- Suero control positivo CP: 30  $\mu$ L diluido (en solución diluyente).
- Suero control negativo CN: 30  $\mu$ L diluido (en solución diluyente).
- Suero problema: 30  $\mu$ L diluido (1:8, 1:16, 1:32 1:64.)
- Se colocó la lámina en cámara húmeda e incubo a 37°C por 30 minutos.
- Se lavo las láminas con PBS(ANEXO 2) por 3 veces consecutivas por 10 minutos cada una.
- Posteriormente se escurrió los bordes de la lámina con papel y dejar secar a temperatura ambiente.
- Se agrego 30  $\mu$ L de anti-IgG humano marcado con fluoresceína (titulada y diluida en solución diluyente de conjugado) en cada área circular e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Se lavo y dejo secar. Se coloco unas gotas de glicerina tamponada y sobre ella una laminilla. Y finalmente se observo en microscopio de fluorescencia a 40X de aumento. (WHO/LEISH/96/40 modificado)

## 2.2. LECTURA

Al microscopio de fluorescencia se observo en el suero de referencia positiva toda la superficie del parásito de un color verde amarillento fluorescente (Figura 10) y en el suero control negativo se observaro el parásito de color rojizo opaco (Figura 11).

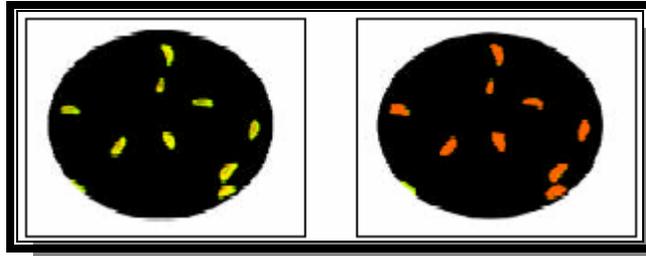


Figura 10

Figura 11

### 2.3. RESULTADOS:

**POSITIVO:** Se detecta presencia de anticuerpos anti Leishmania evidenciados por la fluorescencia del parásito (color verde amarillento)

**NEGATIVO:** No se detecta presencia de anticuerpos anti Leishmania evidenciado por ausencia de fluorescencia del parásito (color rojizo opaco).

## 3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

### 3.1. Extracción de ADN de cultivos

En un tubo estéril eppendorf de 1,5 ml colocar 200 ul de agua destilada estéril y con la ayuda de una pipeta pasteur colocar unas gotas de cultivo. Se incubó de 95-100°C por 5 minutos para luego centrifugar a 12000 RPM por 2 minutos, se recupero el sobrenadante en otro tubo rotulado, y este se guarda a -20°C para su uso como control positivo en la PCR. En caso de estar turbio centrifugar el sobrenadante nuevamente. (Harris Eva 1998)

### 3.2. Extracción de ADN de muestras

Para sangre alícuotar 500 ul de sangre en un tubo eppendorf de 1,5 ml y asegurar con parafilm, las muestras de lesión o biopsias se completan con buffer TE 1X a 500 ul se asegura con parafilm para así llevar a incubación en baño de aceite de 95 a 100 °C por 15 minutos. Se sacaron los tubos del aceite caliente, dejarlos enfriar un poco y se añadió 250 ul de fenol y 250 ul de cloroformo, se mezcló suavemente y centrifugo a 12000 rpm por 15 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes a otros tubos eppendorf previamente identificados para añadir igual volumen de cloroformo. Homogenizar, agitando suavemente los tubos, se centrifugaron los tubos por 15 minutos a 12 000 rpm, y se recuperaron los sobrenadantes a otros tubos eppendorf previamente identificados, se añadió etanol absoluto frío 2 volúmenes y acetato de sodio al 10% a la fase acuosa recuperada para dejar en refrigeración a -20° C por dos horas o toda la noche.

Se llevo nuevamente a centrifugar los tubos por 15 minutos a 12 000 rpm, decantando el sobrenadante de los tubos.

Se añadió 500 ul de etanol al 70% y homogenizar agitando suavemente los tubos, centrifugar los tubos por 15 minutos a 12 000 rpm. Se decantaron los tubos y se dejaron evaporar.

Se añadió 20 ul de agua destilada estéril y se guardo a -20° C hasta su procesamiento. (Harris Eva 1998 modificado)

### 3.3. Preparación del mastex mix

Los primers específicos para *Leishmania spp.* fueron:

primer 13A 5' - GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3

primer 13B 5'- ATTTTACACCAACCCCAGTT-3'

Reactivos	[C] inicial	[C] Final	Vol /tubo ul
Buffer	10x	1x	1.25
dNTPs	5mM	0,2 mM	0.5
Primer 13A	10 uM	1.0 uM	1.25
Primer 13B	10 uM	1.0 uM	1.25
Mg Cl <sub>2</sub>	25 mM	2.0 mM	1.0
Taq	5 UI/ml	0.125 UI/ml	0,0625
H <sub>2</sub> O	----- -	-----	4.5625
DTT	100 mM	1 mM	0,125

Tabla 2. Preparación del master mix para la realización del PCR de acuerdo a las condiciones de Belli et al., 1998 modificado con volumen de muestra 2.5 ul.

**3.4. Amplificación:** El programa de amplificación es el siguiente:

Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	
Desnaturalización	94° C	1 minuto	} 35 ciclos
Templado	54 °C	1 minuto	
Elongación	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	10 minutos	
Conservación:	4 °C	tiempo indefinido	

### 3.5. Análisis de la amplificación

Para cada gel se preparo una solución de agarosa al 1,5-1,8% en TBE 1x y calentada hasta disolver completamente la agarosa, no deben verse ni grumos ni granulaciones.

Se dejó enfriar la solución hasta aproximadamente 55 °C. Se agrego Bromuro de Etidio usar 5 uL para cada 100 mL de TBE 1X. Se preparo el molde del gel y se vertió la solución en el molde. (Belli et al., 1998)

Poner el gel en la cámara de electroforesis y agregar TBE 1 X cuidando de que este cubra el gel. Posteriormente sembrar las muestras en el orden determinado.

Correr el gel a 150 voltios por el espacio de 20 minutos aproximadamente.

Finalmente observar la corrida en el transiluminador de Luz ultravioleta. (Harris Eva et al. ,1998)

## **F. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO**

Una vez realizado el diagnóstico, el médico procedió a realizar previamente el electrocardiograma y otros estudios pertinentes al caso para que los pacientes no sufriesen daños colaterales por el tratamiento con glucantime, todo esto realizado por el equipo multidisciplinario.

### **1. PRIMERA EVALUACIÓN**

Se realizo la evaluación de tratamiento con glucantime mediante la PCR de pacientes que hayan finalizado su tratamiento(T1), a los cuales se les tomo una muestra de sangre periférica como se indica anteriormente, de la cual posteriormente se realizo la extracción de ADN del parásito para luego aplicar la PCR. Estos resultados son reportados y entregados al hospital de Rurrenabaque para su posterior entrega al paciente, y en algunos casos a los pacientes directamente.

## 2. SEGUNDA EVALUACIÓN

Se realizó la segunda evaluación al mes de finalizado el tratamiento (T2) con glucantime mediante la PCR de pacientes, a los cuales se les tomó nuevamente una muestra de sangre periférica. Se entregaron los resultados igual que en la primera evaluación.

## 3. TERCERA EVALUACIÓN

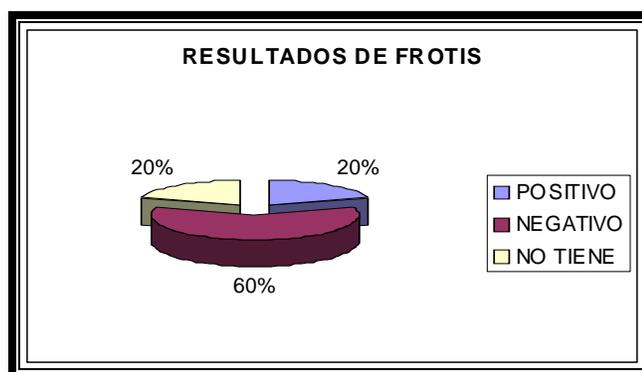
Esta evaluación es igual a las anteriores con la diferencia que esta se realiza a los seis meses de finalizado el tratamiento (T3).

## V. RESULTADOS

Se estudiaron 90 pacientes del hospital de Rurrenabaque, algunos pacientes provenientes de comunidades como el Rincón del tigre, Nueva idiamas, Ixiamas, Tahua, Tumupasa, San Buena Ventura Bella Vista, Santa Rosita entre otras.

### A. FROTIS

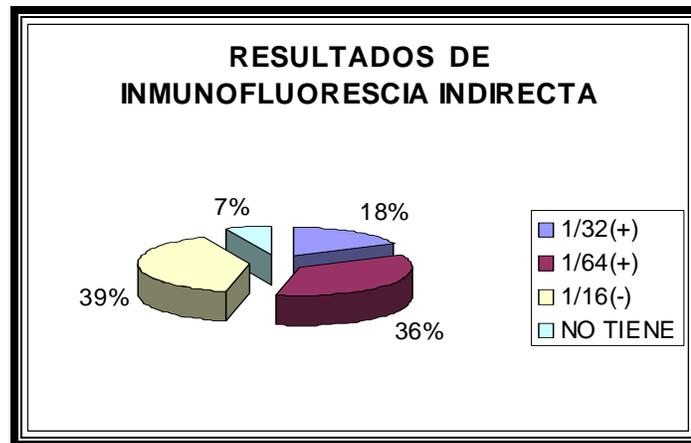
En una población total de 90 pacientes que se les realizó el diagnóstico de Leishmaniasis mediante el frotis, dio los siguientes resultados:



**Gráfica No.1. Resultados de frotis. Muestra pacientes con resultado positivo a la prueba**

Sólo el 20%(18) de la población dio resultado positivo de estos pacientes. Y el 60%(54) dio resultado negativo, y el restante 20% no cuenta con frotis porque no se recomienda para pacientes con L.mucosa. (Gráfica No.1)

## B. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA



**Gráfica No. 2.- Resultados de inmunofluorescencia indirecta. Muestra el porcentaje de pacientes que resultaron positivos a la inmunofluorescencia indirecta.**

Con la inmunofluorescencia indirecta se obtuvieron mejores resultados que con el frotis, ya que el 54% (49) de los pacientes dio serología positiva, esto considerando las diluciones 1:32 y 1:64 y el 39% (35) de los pacientes dio resultado negativo como se observa en la gráfica No.2.

## C. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

De todos los pacientes que se recolectaron las muestras tanto de sangre como de lesión todos dieron resultado positivo al PCR universal para la Leishmaniasis (Foto 1)

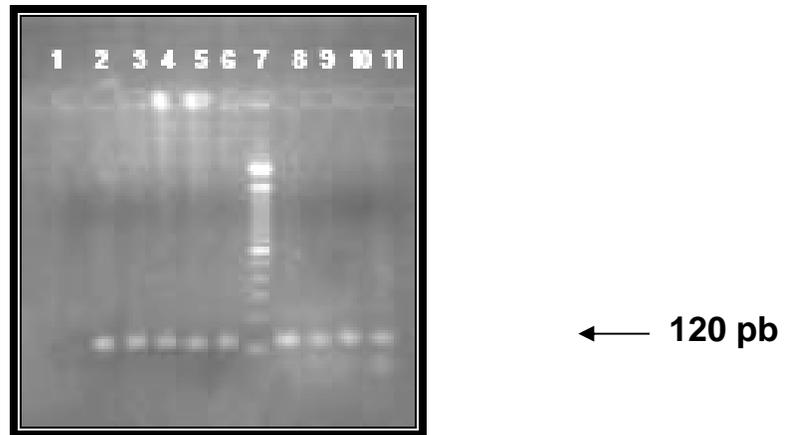


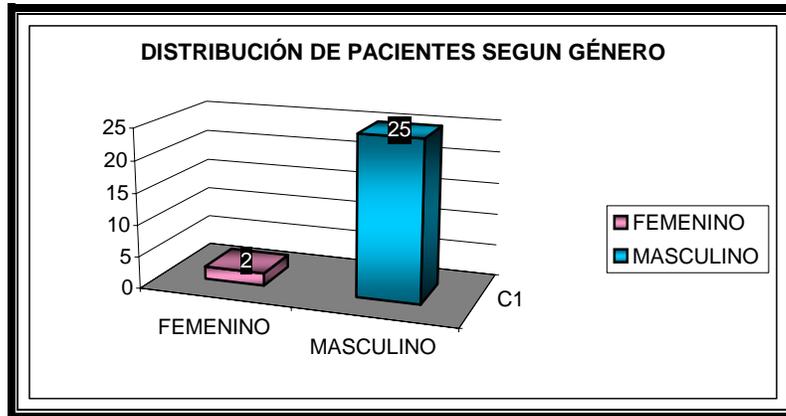
Foto No. 1 Productos de amplificación de PCR a partir de 3 diferentes especies de *Leishmania*. En cada carril se colocó 10 uL de muestra: 1 (Control negativo (*T. cruzi*)), 2 (*L. amazonensis* PH8), 3 (*L. braziliensis* M 2903), 4 (*L. donovani* PP75) 5 (M1), 6 (M2), 7 (Marcador), 8 (M3), 9 (M4), 10 (M 5), 11 (M6) (Siendo M = muestra).

En la foto No.1 Se observan los resultados de PCR tanto de los controles positivo (ADN de cepas de referencia de *Leishmania*) como negativo (ADN diferente al de *Leishmania*), observándose además una banda de 120 pb que esta un poco superior al marcador de peso molecular (100 pb) Puede evidenciarse además que las bandas de las muestras positivas se encuentran a la misma altura que el control positivo lo cual es reportado como resultado positivo, y que en el carril del control negativo no hubo amplificación, lo cual respalda la especificidad de la PCR.

#### D. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN EVALUADA A T1, T2 Y T3 MEDIANTE LA PCR.

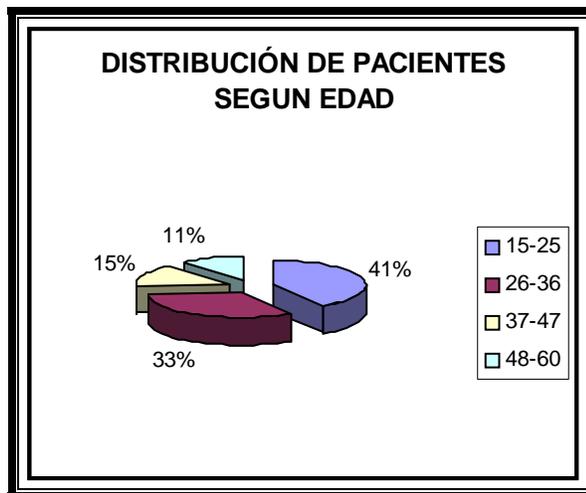
Debido a la distancia de ubicación de los de los domicilios, falta de medios de transporte y de buenos caminos, y a la dispersión de los pacientes en busca de mejores posibilidades laborales, de los 90 pacientes que se presentaron al diagnóstico sólo quedaron 27 para la evaluación de tratamiento con glucantime.

De los 27 pacientes el 92,59%(25) eran del género masculino y el 7% (2) pertenecían al género femenino como se observa en la gráfica No. 3

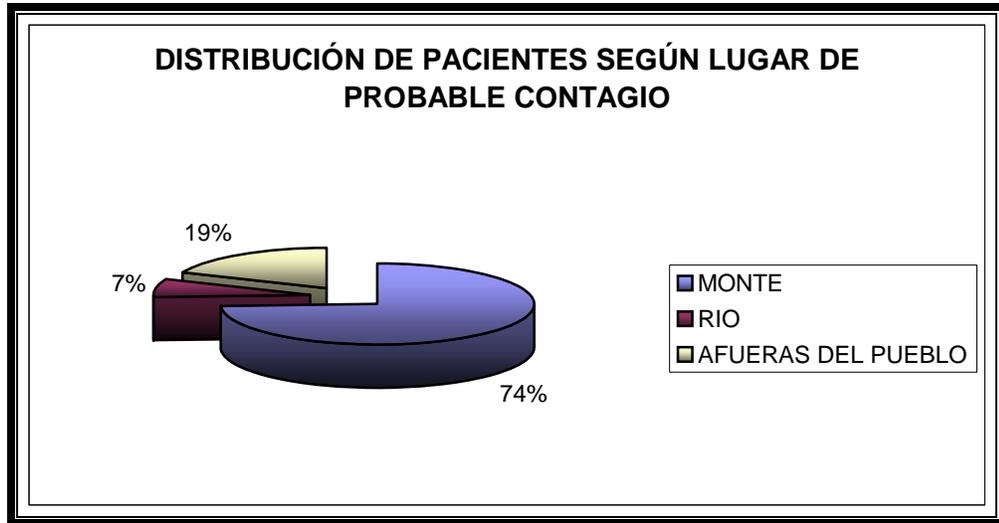


**Gráfica No. 3. Distribución de pacientes según género. Nótese la mayor cantidad de pacientes del presente estudio es del sexo masculino.**

Respecto a la edad de los pacientes, estuvo comprendida entre los 15 años y 60 años con un promedio de 30.63 años. Los grupos de edades más afectados por la leishmaniasis fue el de 15-25 años con 11 casos (40.34%), y el grupo menos afecta es el de mayores de 40 años se dieron 3 casos (11.11%) (Graf. No.4)



**Gráfica No. 4 Distribución de pacientes según edad. La población más afectada es la comprendida entre 15-25 años.**



**Gráfica No. 5. Distribución de pacientes según lugar de probable contagio**

Cuando se estudió el **lugar de contagio**, se pudieron registrar varios sitios, siendo el más importante por su frecuencia: el ingreso al monte o la selva con 20 casos (74%), y en la orillas de los ríos fue la de menor frecuencia con 2 casos (7%). (Gráfica No 5).

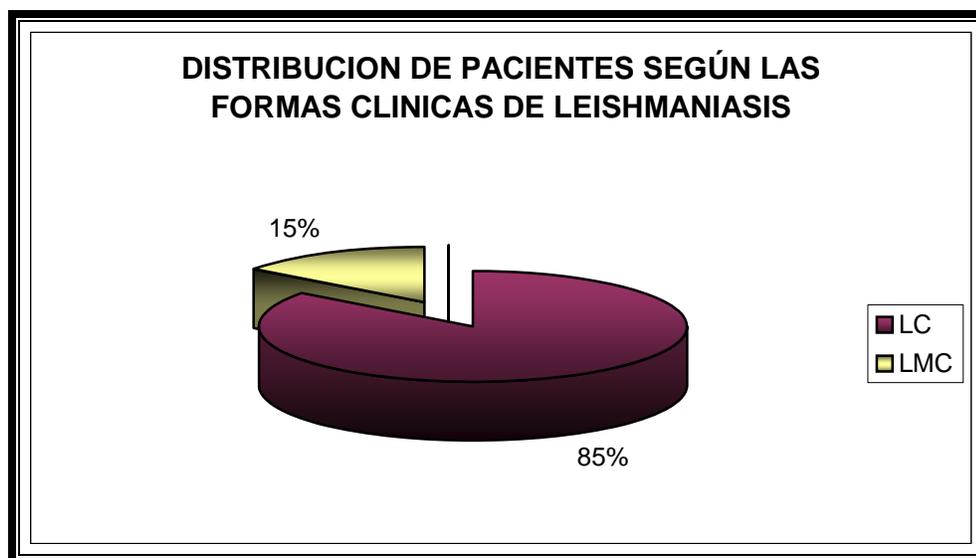
En cuanto al **factor desencadenante** de la lesión, la picadura de insecto fue un factor en todos los casos.

Al analizar el **tiempo de enfermedad** se encontró que la mayoría, 21(77.77%) pacientes presentaron tiempo de enfermedad de menores a un año al momento del diagnóstico; y el tiempo de haber enfermado más largo correspondió a los doce y trece años de haber padecido la enfermedad con un porcentaje de 3.715%(1) como se observa en la (tabla No.3).

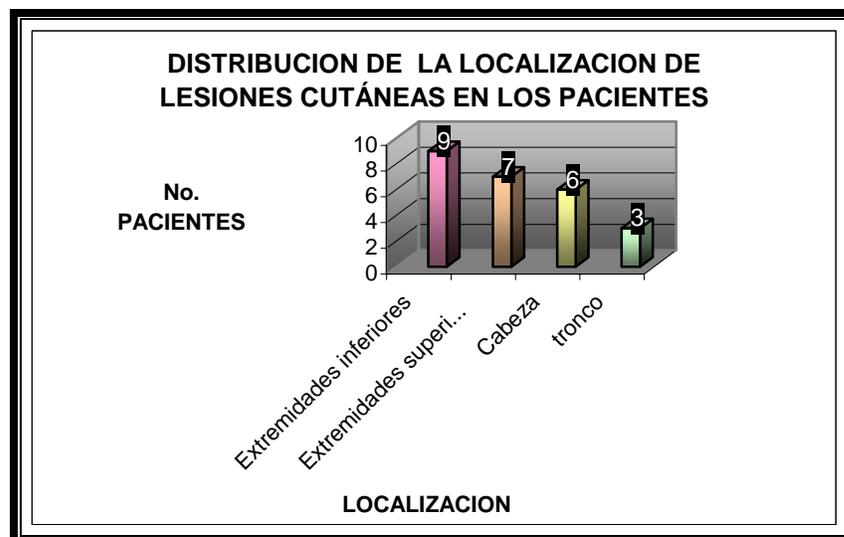
**Tabla 3. Frecuencia del tiempo de enfermedad en años de los 27 pacientes.**

Tiempo Enfermedad (años)	Frecuencia	Pocentaje
< 1	21	77.77%
1	2	7.40%
5	2	7.40%
12	1	3.715%
13	1	3.715%
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100.0</b>

Sobre las **Formas Clínicas** observadas, de los 27 pacientes, 23 pacientes (85.19%) presentaron la forma clínica de Leishmaniasis Cutánea (LC); 4 pacientes (14.81%) Leishmaniasis Mucosa o muco-cutánea (gráfica No. 6).



**Gráfica No. 6 Distribución de pacientes según las formas clínicas de leishmaniasis**



**Gráfica No.7 Distribución de la localización de lesiones cutáneas en los pacientes.**

La localización de las lesiones cutáneas fue principalmente en extremidades inferiores con 9 pacientes (33.33%), la localización de lesiones ubicadas en el tronco fueron las menos frecuentes, con 3 pacientes (11.11%) (Gráfica No. 7).

Al estudiar el **tipo de lesión cutánea**, predominó el tipo ulcerativo en este grupo de evaluación de tratamiento.

**Tabla 4. Distribución de pacientes según ocupación**

OCUPACION	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
AGRICULTOR	10	37,00%	37,00%
AMA DE CASA	2	7,40%	44,40%
COMERCIANTE	2	7,40%	51,90%
ESTUDIANTE	3	11,10%	63,00%
GUIA TURISTICO	2	7,40%	70,40%
OTROS	8	29,60%	100,00%
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>100,00%</b>	<b>100,00%</b>

Se evidencia por lo datos obtenidos que el grupo más afectado es el de **ocupación** agricultor con 37%(10), y los grupos menos afectados son los de ama de casa, comerciante y guía turístico con un 7,40% (2). (Tabla No. 4) Esto debido a la exposición al vector.

LUGAR DE TRABAJO	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
FUERA DEL PUEBLO	14	51,90%	51,90%
PUEBLO	13	48,10%	100,00%
Total	27	100,00%	100,00%

Tabla 5. Distribución de pacientes según el lugar de trabajo

De acuerdo al **lugar de trabajo** también se puede saber si la población esta en riesgo o no de contraer la enfermedad mientras trabaja, por lo cual la mayoría de los pacientes trabaja fuera del pueblo 51.90 %(13) y el 48,10%(10) lo hace en el pueblo.(Tabla 5)

PROCEDENCIA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
BENI	9	33,30%	33,30%
LA PAZ	10	37,00%	70,40%
ORURO	1	3,70%	74,10%
POTOSI	1	3,70%	77,80%
SANTA CRUZ	2	7,40%	85,20%
SUCRE	4	14,80%	100,00%
Total	27	100,00%	100,00%

Tabla 6. Distribución de pacientes según su procedencia

Otro factor importante que se debe mencionar es de la **procedencia** ya que por las constantes migraciones se debe determinar que población esta más afectada, si los colonos o los pobladores naturales de la región, es así que el 37%(10) pertenece al departamento de La Paz con un alto porcentaje de casos de leishmaniasis, seguido de l departamento del Beni con un 33.30%(9), Sucre con un 14.80%(4), Santa cruz con un 7.4%(2) y finalmente Oruro y Potosí con un 3.7%(1) cada uno. (Tabla 6)

Generalmente en áreas endémicas como la de trabajo es importante saber si se recibió anteriormente el tratamiento, por lo cual el 85.20%(23) de la población no recibió tratamiento con glucantime, y el 14.80% si lo hizo. (Tabla 7)

HA RECIBIDO TRATAMIENTO	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
Si	4	14,80%	14,80%
No	23	85,20%	100,00%
Total	27	100,00%	100,00%

Tabla 7. Frecuencia de pacientes que recibieron anteriormente tratamiento con glucantime

## D. EVALUACIONES DEL TRATAMIENTO

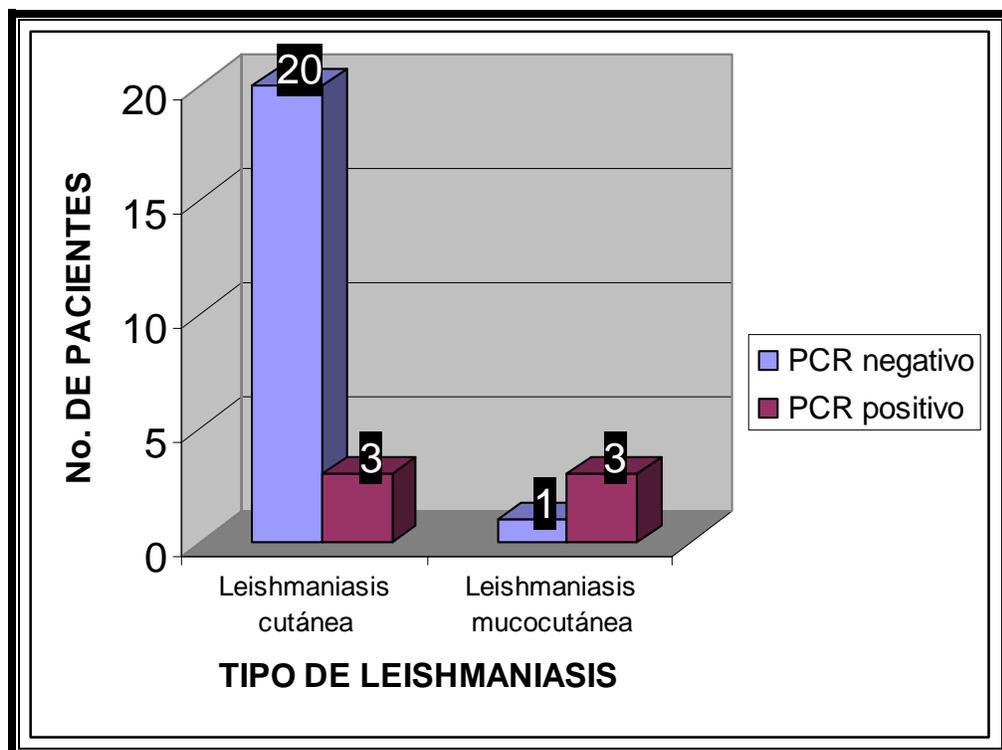
### 1. PRIMERA EVALUACIÓN

Esta evaluación a T1(al finalizar el tratamiento) se realizó mediante la PCR, con los resultados obtenidos se registraron 20 pacientes con L. cutánea con resultado negativo y 3 con resultado positivo, 3 pacientes con L. mucocutánea

con resultado positivo y 1 pacientes con L. mucocutánea con resultado negativo (Tabla No. 8 y gráfica No.8).

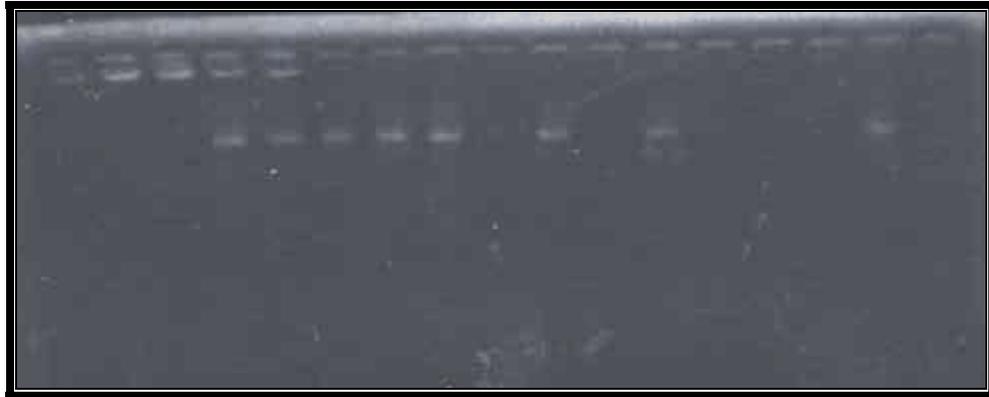
Tipo de leishmaniasis	L. cutánea	L. muco-cutánea o L. mucocutánea	total
PCR positivo	3	3	6
PCR negativo	20	1	21
Total	23	4	27

**Tabla 8. Distribución de pacientes según tipo de leishmaniasis y resultado de PCR a T1**



**Gráfica No. 8.- Distribución de pacientes según tipo de leishmaniasis y resultado de PCR a T1**

Teniendo en cuenta que el tratamiento para pacientes con L. mucosa es 30 días y de pacientes con L. cutánea 20 días.



**Foto 2. Resultados de PCR después finalizado el tratamiento(T1), Productos de amplificación de PCR 1 (Control de agua cuarto blanco), 2 (control de agua cuarto azul),3(control negativo, ADN de *T. cruzi*), 4(control positivo : ADN de *Leishmania* ) 5 (M1), 6 (inhibidor M1), 7 (M2), 8 (inhibidor M2), 9 (M3), 10 (inhibidor M4), 11 (M4), 12(inhibidor M4),13(M5) 14 (inhibidor M5),15(M6) , 16 (inhibidor M6), 17(M7)**



**Foto 3. (Continuación de la foto 2)1(inhibidor M7,) 2 (M8), 2 (inhibidor M8), 4 (M9), 5 (inhibidor M9), 6 (M10), 7 (inhibidor M10), 8 (M11), 9(inhibidor M11)**

Se observa en la foto 2 que se utiliza un control de inhibición para evitar falsos negativos, ya que hay muchas sustancias y medicamentos que pueden inhibir el PCR en nuestro caso el glucantime, como se evidencia con M5 que fue inhibida. Se considera negativo cuando no hay banda en el carril de la muestra pero si en el carril del inhibidor como en los carriles 13 y 14 que corresponden a M5, y es positiva cuando se observa una banda en ambos carriles como en los carriles 5 y 6 que corresponde a M1. Por tanto M1 y M2

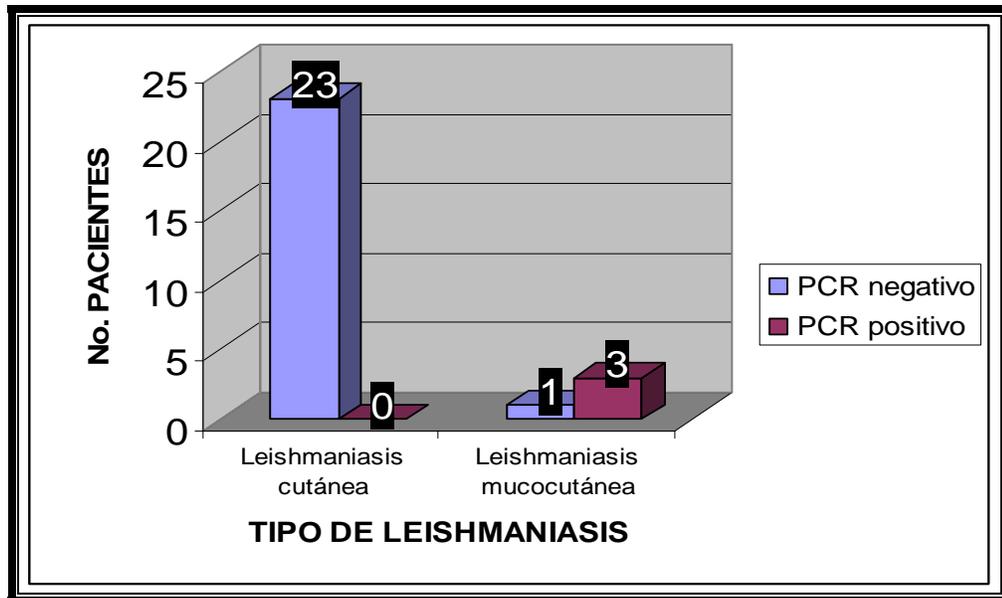
dan resultado positivo y a excepción de M5 todas las demás muestras dan resultado negativo.

## 2. SEGUNDA EVALUACIÓN Y TERCERA EVALUACIÓN

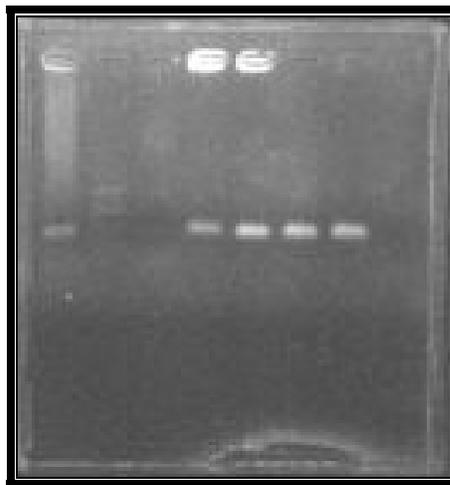
Los pacientes a T2 evolucionaron mejor respecto al tratamiento con glucantime, tres pacientes más dieron resultado negativo a la PCR .como muestra la (Gráfica No.9, tabla No. 9), sin embargo los pacientes con L. cutánea todos sanaron, al igual que un paciente con L. mucocutánea, por el contrario 3 pacientes con L. mucocutánea volvieron a dar resultado positivo, se muestran algunos de estos resultados a de PCR en la foto 4.

Tipo de leishmaniasis	L. cutánea	L. muco-cutánea	total
PCR positivo	0	3	3
PCR negativo	23	1	24
Total	23	4	27

**Tabla 9. Distribución de pacientes según tipo de leishmaniasis y resultado de PCR a T2**



Gráfica No 9.- Distribución de pacientes según tipo de leishmaniasis y resultado de PCR a T2



← 120 pb

Foto 4. Muestra los productos de PCR a T2: 1(control positivo), 2 (control negativo) ,3 (M1) ,4(M2), 5 (M3) ,6(M4), 7(M5), 8 (M6)

En la foto 4 se observan los resultados de PCR sin controles de inhibición, considerándose positivos aquellas muestras que cuentan con una banda en el carril en el cual se las sembró (4, 5, 6 y7), y negativas aquellas que no presenten banda (3 y 8).

A T3 se obtuvieron los mismos resultados que ha T2.

## VI. DISCUSIÓN

El presente trabajo ha permitido evidenciar la capacidad de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la leishmaniasis, para la evaluación de tratamiento con glucantime de la leishmaniasis, que frente a las técnicas convencionales dio mejores resultados de diagnóstico, es de vital importancia en términos epidemiológicos y de control de la enfermedad, debido a que en zonas endémicas, la sintomatología de esta enfermedad puede ser confundida con otras enfermedades, esto es apoyado por autores como Harris E. et al., 1998; Hernandez-Montes et al., 1998.

El uso de la PCR se ha convertido en la técnica preferida para realizar el diagnóstico de leishmaniasis puesto que los métodos parasitológicos convencionales no son suficientemente sensibles, en el estudio realizado se comprobó que esta técnica tuvo mayor sensibilidad y especificidad ya que los 90 pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis, el 100% dio resultado positivo.

La sensibilidad de las técnicas microscópicas y las histopatológicas, se hallan a partir del 17 hasta el 83% para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea (LC) (Andresen, K., et al 1996), dependiendo de la presentación clínica, de la especie del parásito, de la técnica empleada, y de otros factores.

Varios estudios han comparado el poder de diagnóstico la PCR de ADNK de parásitos de los complejos de *Leishmania braziliensis* y *L. mexicana* que causan la LC, con técnicas convencionales. A excepción de algunos casos, los

análisis de basados en la PCR fueron más sensibles que los métodos parasitológicos clásicos de diagnóstico (Aviles, H., et al ,1999; Bensoussan E. et al.,2006; Medeiros, A. eta al.2002).

Demostrando que la PCR, es superior a los métodos parasitológicos para el diagnóstico del LC, identificando a pacientes cuyo frotis era negativo por la examinación microscópica. Sin embargo, la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico convencionales aumenta, si se utilizan en combinación.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es uno de los métodos serológicos más utilizados, cuya cuantificación se correlaciona bien con el grado de extensión de la infección, aunque los títulos de anticuerpos no suelen ser altos.

Los estudios de sensibilidad de esta técnica en otros países revelan resultados que van desde el 66,6% hasta el 82%.

La reacción que se produce en la IFI no es específica para los anticuerpos anti-Leishmania, pues da reacción cruzada con sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas, lupus eritematoso, malaria, toxoplasmosis, amebiasis, paracoccidiomicosis, e inclusive con tuberculosis pulmonar.

**(Guimaraes MC)**

La sensibilidad de la IFI, en el presente estudio aunque moderadamente buena, sólo detectó al 54%(49) de pacientes con leishmaniasis, pero no difiere de los realizados en otros países.

Como se esperaría de un cuadro más avanzado, se observa que la sensibilidad de la IFI en leishmaniasis tegumentaria (LT) con lesiones mucosas es mayor

que en lesiones cutáneas, aunque no más del 10%. Este resultado coincide con los de otros trabajos publicados en Brasil. En caso de la enfermedad cutánea, no existe aumento significativo de la sensibilidad con relación al tiempo de evolución de las lesiones. (Se consigue en: <http://www.iics.una.py/n/pdf/revista/oddone2005%2015-18.pdf> ; 6 de febrero de 2007)

Además, ante la posibilidad de que la presencia de eventuales casos de doble infección Chagas-leishmaniasis pudiera provocar un falso aumento de la sensibilidad de la IFI, que no tiene una diferencia significativa con el de otros países. (Se consigue en: <http://www.iics.una.py/n/pdf/revista/oddone2005%2015-18.pdf> ; 6 de febrero de 2007)

El análisis del frotis por microscopia en nuestro estudio fue de tan sólo un 20% de detección lo cual indica que sería mejor utilizar ambos métodos para el diagnóstico ya que ambos sumarían un 74% total para detección del parásito que provoca la Leishmaniasis., claro esto en ausencia de la PCR..

La PCR basada en los iniciadores 13 A y 13 B se ha utilizado con éxito en la detección de ADNk de parásitos de *Leishmania* sp., en diferentes estudios epidemiológicos, especialmente, para el diagnóstico de la Leishmaniasis en pacientes como lo corroboran Belli, Rodríguez y Harris 1998. La sensibilidad y especificidad de esta técnica para la detección de leishmaniasis fue realizada por varios investigadores (Belli, Rodríguez y Harris 1998) que afirman que la técnica es la de mejor elección para la detección de *Leishmania*, aunque no siempre esta disponible para la población por su elevado costo la opción sería usar en conjunto todas las técnicas

convencionales para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de esta enfermedad.

Al realizar la evaluación de pacientes tratados con glucantime la población se redujo hasta 27 pacientes que realizaron las 3 evaluaciones de tratamiento con glucantime. Esto debido a que la población se hallaba distribuida en diferentes comunidades muy lejanas unas de otras, no se los encuentra en sus casas, no quieren realizarse la prueba, se mudaron de casa.

Por lo tanto los pacientes fueron 27, de los cuales el 85.19%(23) de los pacientes tenían leishmaniasis cutánea y el 14.81 %(4) pacientes tenían leishmaniasis mucocutánea.

A T1 los pacientes con L. cutánea 85.18%(23) solo 20 dieron resultado negativo de PCR, concordando con la evolución clínica de la lesión.

En cuanto a los pacientes con L. mucosa uno dio resultado negativo a la PCR. Cuando se realiza el PCR a T1 en las fotos 2 y 3 se realizan controles de inhibición (muestra más el control positivo) de las muestras debido a que muchos medicamentos pueden inhibir la PCR, y se utiliza el inhibidor para saber si algo en la muestra de ADN esta causando que se inhiba la PCR.

A T2, (al mes de finalizado el tratamiento) Los pacientes con L. cutánea el 85.19%(23) dieron resultado negativo a la PCR. En los pacientes con leishmaniasis mucocutánea mantuvieron los mismos resultados que en T1, demostrando que para el tratamiento de pacientes con L. mucosa o muco cutánea se debe extender el tratamiento a 40 - 60 días de acuerdo a la evolución o emplear otro tratamiento o, esto a su vez implicaría que el

paciente debería estar bajo observación medica todo este tiempo ya que con 30 días de tratamiento muchos pacientes tienen síntomas de cansancio físico, dolor de cabeza; pero no son tan alarmantes como los reportados con anfotericina B.

Los resultados de evaluación de tratamiento mediante la PCR a T3 fueron los mismos que ha T2, es importante realizar los controles para confirmar la eliminación del parásito después del tratamiento mediante la PCR.

Además se valoro el potencial de la PCR en la evaluación de tratamiento de la leishmaniasis, para determinar la efectividad del glucantime en la población en estudio. Los pacientes que presentaron resultado de PCR positivo después de la evaluación a T3, nos estarían indicando que puede darse una resistencia del parásito al glucantime o que la carga parasitaria sea tan alta que se debe alargar el tiempo de tratamiento con glucantime a 60 días. Aquí surge otro problema, que el centro de salud que proporciona el tratamiento con glucantime tiene el esquema de tan sólo 30 días y volver a realizar los oficios correspondientes tardaría un algún tiempo, lo cual repercute en que el paciente deje a medias su tratamiento. Puede inclusive darse en el transcurso de es tiempo una re-infección de pacientes tratados. Otros autores como Mollinedo y col., 2002 después de realizar el tratamiento durante 60 días, sino obtienen buenos resultados de curación recurren a la Anfotericina B, pero esta produce reacciones adversas severas, que dejan al paciente sin poder trabajar lo cual hace que los pacientes prefieran no realizarse este tratamiento, otros desconocen de este medicamento , sin embargo algunos si desean sanar completamente pero la anfotericina B no esta disponible ya que era facilitada a los pacientes por diferentes ONG a

bajos costos y con hospitalización, pero muchas de ellas ya no se encuentran en nuestro país.

Un problema que se encontró fue la accesibilidad al medicamento ya que el analfabetismo, la malnutrición, así como los escasos recursos económicos de la población y la distancia de las zonas rurales hacia los establecimientos de Salud, plantean un serio problema para la atención de pacientes afectados por la leishmaniasis.

También debe considerarse que el hombre al invadir el nicho ecológico del flebótomo sin tomar las medidas necesarias como: educación sanitaria, vestimentas adecuadas para su protección al penetrar en el monte, protección adecuada de las viviendas y control del vector, se expone a ser picado y a padecer la enfermedad. Lo cual puede producir un brote de leishmaniasis en la población.

Los estudios clínicos epidemiológicos nos permiten señalar factores de riesgo de exposición a la enfermedad y diseñar estrategias de prevención. La edad y el sexo, constituyen factores de riesgo para leishmaniasis, pues, las personas jóvenes, o adultos jóvenes, principalmente varones, incursionan mayormente en áreas endémicas exponiéndose al vector transmisor. Lo cual apoya a que el grupo que se dedica a la agricultura (37%) sea el más afectado en nuestro estudio y que este grupo a su vez se encuentre entre 15-25 años el cual representa al 41% de la población afectada por esta enfermedad, y no solo esto sino que también el género más afectado sea el masculino con el 92.59%.

Por todas estas razones es importante realizar un diagnóstico rápido y confiable para no sólo disminuir los casos sino también evitar los brotes de leishmaniasis, motivo por el cual la PCR sería la técnica de mejor elección.

Otra utilidad importante de la PCR sería la de confirmar la eliminación del parásito después del tratamiento de la leishmaniasis (Cáceres y col 2002), esto apoyaría nuestro estudio de utilizar la PCR para la evaluación de tratamiento con glucantime en pacientes con leishmaniasis.

## VII. CONCLUSIONES

Se logro realizar el diagnóstico de la Leishmaniasis por métodos convencionales en pacientes de la localidad de Rurrenabaque con diagnóstico presuntivo de leishmaniasis, obteniéndose una baja detección con el frotis sólo un 20% de pacientes dio resultado positivo, con la IFI el 54% de los pacientes dio resultado positivo, aunque son técnicas de bajo costo y están más alcance de los pacientes.

Al determinar la presencia de *Leishmania spp.* a través de la amplificación de ADN en raspados, infiltrados de lesiones, sangre total de pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis, se pudo evidenciar que es la técnica de mejor elección en el diagnóstico es la PCR, ya que sumadas las técnicas convencionales sólo producen un 74% de detección mientras que la PCR un 100% de detección.

La edad, si constituye un factor de riesgo para leishmaniasis, pues, las personas jóvenes, o adultos jóvenes, resultaron ser los más afectados en el presente trabajo, es así el grupo más afectado fue el de 15-25 años con 11 casos (40.34%), y principalmente fueron varones con un 92,59%(25) y el 7% (2) fueron mujeres.

Como la principal ocupación es la de agricultor con el 37%(10) y es mayormente realizada por los colonos que llegan a la región, es también considerado un factor riesgo para enfermar con leishmaniasis debido a la exposición con el vector, además el lugar de principal contagio fue el de ingreso al monte con el 74%(20) lo cual frecuentemente realizan los agricultores para lograr obtener una buena producción de cultivos. No

importa que desempeñen diferentes ocupaciones el factor desencadenante siempre es la picadura del mosquito.

Es importante saber si trabajan fuera del pueblo 51.90 %(13) ya que corren mayor riesgo de contraer la enfermedad que los que trabajan dentro del pueblo 48,10%(10).

El tiempo de enfermedad fue en el 77.77%(21) menores a un año, lo cual indica que la población esta tomando conciencia en recurrir a un centro de salud y no a utilizar remedios caseros para su curación, o que éstos no son tan efectivos, y el 22.23% restante no recurrió a un centro de salud y sus lesiones sanaron espontáneamente, o en el centro de salud no contaban con el tratamiento.

La localización de las lesiones cutáneas es principalmente en extremidades inferiores 33.33%(9), aunque las menos frecuentes sean en el tronco con una buena educación sanitaria se evitarían muchos casos de leishmaniasis.

Las principal forma clínica observada es la de Leishmaniasis Cutánea con el 85.19%(23) y la menos frecuentes fueron la leishmaniasis mucosa o mucocutánea (LM) con un 14.81%(4).

No importa de donde procedan todos tienen la misma posibilidad de enfermar de leishmaniasis, es así que el 37%(10) pertenece al departamento de La Paz con un alto porcentaje de casos de leishmaniasis, seguido del departamento del Beni con un 33.30%(9), Sucre con un 14.80%(4), Santa Cruz con un 7.4%(2) y finalmente Oruro y Potosí con un 3.7%(1) cada uno.

El 14.80% de los pacientes recibió anteriormente el tratamiento con glucantime.

Se realizó el seguimiento del tratamiento con glucantime al finalizar el tratamiento obteniéndose que el 77.78% de los pacientes sanaron, al mes y a los seis meses de finalizado el tratamiento que el 88.88% de los pacientes sanaron definitivamente, esto es corroborado por la cicatrización total de las lesiones producidas por parásitos del género *Leishmania*, con lo cual se afirma que el glucantime administrado correctamente se convierte en un buen tratamiento contra la leishmaniasis y la PCR en la técnica de elección para la evaluación del tratamiento.

Se aplicó la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico y evaluación de tratamiento con glucantime en pacientes con leishmaniasis de la localidad de Rurrenabaque, concluyendo que la PCR es la técnica que mejores resultados dio tanto en el diagnóstico como en la evaluación post tratamiento de la leishmaniasis.

## VIII. RECOMENDACIONES

Los datos obtenidos de evaluación de tratamiento deben ser solventados, con un estudio que tenga un número mayor de muestras, que sean representativos para un análisis estadístico y se pueda dar un juicio de valor aun más sólido.

En estudios en los que se fuese a evaluar la eficacia de un tratamiento para la leishmaniasis se recomienda utilizar técnicas que ayuden a diferenciar la infección de una reinfección para no pensar que se esta produciendo resistencia del parásito al medicamento, entre las técnicas que nos pueden ayudar para realizar esta diferenciación se encuentran las isoenzimas, que serían muy útiles pero para aplicarla se necesita del cultivo de la cepa de leishmania del paciente, esta no es la única técnica ya que existen técnicas como el RAPD y RFLP que facilitarían esta diferenciación, sin la necesidad del cultivo.

El contar con el domicilio correcto de los pacientes para realizar los controles, y que estos realmente estén interesados en realizarse las evaluaciones post-tratamiento.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Alvar J, Cañavete C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R. et al. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Reviews* 1997;10(2):298-319.

Alvar JP. La Leishmaniasis: de la Biología y su control. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. 2da edición. 2001. Página 17.

Alvar, Ezquerro. Jorge P, Morretti ML, Corachán Cuyás M. Infecciones causadas por protozoos flagelados hemotísulares. En: Farreras P, Rozman C, editores. *Medicina Interna*. 14a ed. Madrid: Harcourt; 2000. p. 2749 - 2757.

Andresen, K., A. Gaafar, A. M. El-Hassan, A. Ismail, M. Dafalla, T. G. Theander, and A. Kharazmi. 1996. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:133-135

Arrebola,R., Olmo,A., Reche,P., Garvey,E.P., Santi,D.V., Ruiz-Perez,L.M., and Gonzalez-Pacanowska,D. (1994). Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductasethymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J. Biol. Chem.*, 269, 10590-10596.

Arts,G.J. and Benne,R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 39-54.

Aviles, H., A. Belli, R. Armijos, F. P. Monroy, and E. Harris. (1999). PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J. Parasitol.* 85:181-187.

Barker,D.C. and Arnot,D.E. (1981). Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 33-46.

Basselin,M., Badet-Denisot,M.A., and Robert-Gero,M. (1998). Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Trop.*, 70, 43-61.

Basselin,M., Badet-Denisot,M.A., Lawrence,F., and Robert -Gero,M. (1997). Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, **85**, 274-282.

Bastien P y cols., 1990. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40: 53-62

Belli ,A., Rodriguez B., Aviles H., and Harris E., (1998) Simplified polimerase Chain reaction detection of new World Leishmania in clinical specimens of cutaneous Leishmaniasis, *Ann Trop Med Hyg* 58(1), 1998, 102-109

Benne,R., De Vries,B.F., Van den,B.J., and Klaver,B. (1983). The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxi-circle DNA that contains the gene for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames. *Nucleic Acids Res.*, 11, 6925-6941.

Bensoussan Esther, Abdelmajeed Nasereddin, Flory Jonas, Lionel F. Schnur, and Charles L. Jaffe Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis *Journal of clinical microbiology*, Apr. 2006, p. 1435-1439

Berman,J.D., Edwards,N., King,M., and Grogl,M. (1989). Biochemistry of Pentostam resistant *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40, 159-164.

Beverley,S.M. (1991). *Gene amplification in Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 417-444.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;102(2):249-61.

Borst,P. and Ouellette,M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 427-460.

Brewster,S. and Barker,D.C. (2002). Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (Viannia) species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 96 Suppl 1, S55-S63.

Chang,K.P., Fong,D., and Bray,R.S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. *Leishmaniasis*, ., pp. 1-30.

Chiquero,M.J., Perez-Victoria,J.M., O'Valle,F., Gonzalez-Ros,J.M., del Moral,R.G., Ferragut,J.A., Castanys,S., and Gamarro,F. (1998). Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 131-139.

Connor DH, Chandler FW, Schuartz DA, Manz HJ, Lack EE. Pathology of infectious diseases. Connecticut: Appliton & Large; 1997.

Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Curr Pharm Design* 2002; 8 (4):319-42

DESJEUX P.; ARANDA E.; ALIAGA O.; MOLLINEDO S.; (1983); "Human visceral Leishmaniasis in Bolivia; First proven autochthonous case from los Yungas"; *Trans.R.Soc.Med.Trop.Hyg.*; 77 (6) p: 851-852.

Desjeux,P., Piot,B., O'Neill,K., and Meert,J.P. (2001). [Co-infections of leishmania/HIV in south Europe]. *Med. Trop. (Mars. )*, 61, 187-193.

Flores Ch. María Delmans, Bastrenta Brigitte., Postigo I. Jorge R., Mita Mendoza Neida, Cruz Israel, Alvar Ezquerro Jorge. (2004) Leishmaniasis visceral subclínica en 123 individuos de un cantón de la provincia Caranavi-La Paz. *Rev Chil Pediatr* 75 (3); 285-293.

Gari-Toussaint M, Lelievre A, Marty P, Le-Fichoux Y. Contribution of serological tests to the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(3):301-2.

Giannini SH y cols., 1990. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 9-22

Guimaraes MC, Celeste BJ, Corrales EM, Antunes CM. 1991. Comparison on the performance of Leishmania major-like and leishmania braziliensis braziliensis antigen for New World leishmaniasis IgG immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 33 (6): 503-8.

Harris Eva 1998, *Low - cost approach to PCR*. Ed. Oxford university New York

Harris,E., Kropp,G., Belli,A., Rodriguez,B., and Agabian,N. (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1989-1995.

<http://antoniorondonlugo.com/blog/?p=341>

<http://www.galenored.com/trabajos/archivos/129.pdf>

<http://www.iics.una.py/n/pdf/revista/oddone2005%2015-18.pdf>

[http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34437&locale=es\\_ES&textOnly=false](http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/apssa/tkContent?idContent=34437&locale=es_ES&textOnly=false)

Kelly,J.M., Law,J.M., Chapman,C.J., Van Eys,G.J., and Evans,D.A. (1991). Evidence of genetic recombination in Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46, 253-263.

Killick-Kendrick,R., Molyneux,D.H., and Ashford,R.W. (1974). Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 187, 409-419.

Lainson,R. and Shaw,J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In Peters,W. and Killick-Kendrick,R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1., Academic Press, London, pp. 1-120.

Lainson,R., Ready,P.D., and Shaw,J.J. (1979). *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 206, 307-318.

Lainson,R., Ryan,L., and Shaw,J.J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82, 421- 424.

Lambson,B., Smyth,A., and Barker,D. (1999). Sequence homology within a minicircle class of the *Leishmania donovani* complex. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 101, 229-232.

Lambson,B., Smyth,A., and Barker,D.C. (2000). *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.*, 94, 15-22.

LE PONT Francois; *Les Phlébotomes ety les Leishmanioses en Bolivie*; These de Doctorat de l'Université de Paris Sud; 1.990; France.

Levine,N.D., Corliss,J.O., Cox,F.E., Deroux,G., Grain,J., Honigberg,B.M., Leedale,G.F., Loeblich,A.R., III, Lom,J., Lynn,D., Merinfeld,E.G., Page,F.C., Poljansky,G., Sprague,V., Vavra,J., and Wallace,F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, 27, 37-58.

Lopez,M., Inga,R., Cangalaya,M., Echevarria,J., Llanos-Cuentas,A., Orrego,C., and Arevalo,J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 49, 348-356.

McKerrow,J.H., Sun,E., Rosenthal,P.J., and Bouvier,J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 821-853.

Medeiros, A. C., S. S. Rodrigues, and A. M. Roselino. 2002. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:421-424.

MOLLINEDO Sergio & cols. "PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE ENDEMIAS TRANSMITIDAS POR VECTORES"; ISMA; 1.998

MOLLINEDO Sergio; "Kala azar en Bolivia", sometido para publicación.

MOLLINEDO Sergio; MUÑOZ Maruska; TORREZ Miguel; HERVAS Dolly; DESJEUX Philippe; "Once años de estudio de la Leishmaniasis en Bolivia: Aspectos Epidemiológicos"; XI Congreso Latinoamericano de Parasitología; 21 al 26 de Noviembre de 1993; Lima PERU.

Mollinedo y colaboradores (2002) "Manual práctico de tratamiento de Leishmaniasis No 10 "

Mullis, K., Falcoma, F., Scharf, S., Snikl, R., Horn, G. T. & Erlich, H. Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. 51: 260. 1986.

Oddone R1, Canese A2, Maciel JD3, Velázquez GR1, Meza T1, Mendoza de Sánchez MG Tegumentary leishmaniasis: sensitivity of the indirect immunofluorescent assay in patients with parasitological diagnosis ARTICULO ORIGINAL: 15-18

Cáceres Rey Omar, Montoya Piedra Isabel. 2002. Diseño y evaluación de tres lignonucleótidos para la detección de Leishmania por PCR Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica 2002; 19(3)

Opperdoes, F.R. and Michels, P.A. (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. Biochimie, 75, 231-234.

Panton, L.J., Tesh, R.B., Nadeau, K.C., and Beverley, S.M. (1991). A test for genetic exchange in mixed infections of Leishmania major in the sand fly Phlebotomus papatasi. J. Protozool., 38, 224-228.

Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using *in vitro* derived promastigote antigens. J Immunol Methods 2001;252(1-2):105-19.

Ramos, H., Saint-Pierre-Chazalet, M., Bolard, J., and Cohen, B.E. (1994). Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on Leishmania mexicana promastigotes. Antimicrob. Agents Chemother., 38, 1079-1084.

Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., and Perieres, J. (1990). Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann. Parasitol. Hum. Comp, 65, 111-125.

Rodríguez Noris. 2006 " Diagnóstico de leishmaniasis por pcr e identificación de especies mediante hibridación molecular no radioactiva" September 03-15, IVIC, Caracas, Venezuela

Rogers,W.O. and Wirth,D.F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30, 1-8.

Saf'janova,V.M. (1982). Classification of the genus *Leishmania*. *Protozoology, Part 7*,pp. 219-220.

Sanchez Bustamante Alejandro (2000). " Anuario epidemiológico" ; Ministerio de Salud y Prevención Social - dirección Central de Epidemiología.

Sánchez Elizabeth Luz, Náquira Velarde Roman,César Gabriel, Vega Chirinos Emilia Silvia" manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias" 2002 ,Pag 30-33

Sanchez,A., Castanys,S., and Gamarro,F. (1994). Increased P-type ATPase activity in *Leishmania tropica* resistant to methotrexate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 855-861.

Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veeken H. Development and application of 'simple' diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001;190(1-2):69-71.

Simpson,L. (1979). Isolation of maxicircle component of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 76, 1585-1588.

Simpson,L., Simpson,A.M., Kidane,G., Livingston,L., and Spithill,T.W. (1980). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 1053-1063.

Singh S, SIVAKUMAR R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003; 49(1):55-60.

Singh,N. and Rastogi,A.K. (1999). Kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania donovani* express a protein product. *Biochim. Biophys. Acta*, 1444, 263-268.

Tibayrenc,M., Kjellberg,F., and Ayala,F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 87, 2414-2418.

Tibayrenc,M., Kjellberg,F., and Ayala,F.J. (1991). Clonal defence. *Nature*, 350, 385-386. Jimenez,M., Alvar,J., and Tibayrenc,M. (1997). *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. *AIDS*, 11, 569-573.

Turco,S.J. and Descoteaux,A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 65-94.

Van der Ploeg,L.H., Cornelissen,A.W., Barry,J.D., and Borst,P. (1984). Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.*, 3, 3109-3115.

Vannier-Santos MA, Martiny A, De Souza W. *Cell Biology of Leishmania spp.: invading and evading.* *Curr Pharm Desing* 2002;8(4):297-318.

WHO, 1993. *The Leishmaniases.* CTD/MIP/WP. 93.8, WHO/HQ.Geneva.

Wong,A.K. (1995). Molecular genetics of the parasitic protozoan *Leishmania*. *Biochem. Cell Biol.*, 3, 235-240.

Yuri A. Kuryshev, Lu Wang, Barbara A. Wible, Xiaoping Wan and Eckhard Ficker 2006. *Molecular Pharmacology Fast Forward.* Published on January 17, as doi:10.1124/mol.105.019281

**ANEXO 1**  
**ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA**

Fecha de la encuesta: ...../...../...../  
Mes Día Año

CODIGO:.....

**INFORMACIÓN GENERAL**

...../...../.....

1. Apellido paterno Apellido materno Nombres

2. Edad: .....años

3. ,Sexo: Femenino Masculino

4. Estado civil: Soltero(a) Casado(a)  Divorciado(a)  Viudo(a)  Otro

5. Procedencia: .....

6. Residencia habitual.....

7. Residencia actual.....

8. Tiene usted familia: Si  No

9. Cuántos miembros hay en su familia.....

10. Donde usted vive consideran que es un área:

Urbana  Peri urbana  Rural

11. Ocupación?.....

12. Lugar donde trabaja actualmente?.....

13. Horas del día en el que trabaja?.....

14. Describa el tipo de ropa que usa para trabajar.....

**INFORMACION CLINICA**

15. Ha enfermado alguna vez de leishmaniasis o espundia: SI  NO

16. Indique la fecha en la que enfermo: .....

17. Ha visto otros casos (indique la localidad y el lugar): SI  NO

.....

18. Acudió al médico o centro de salud: Si  No

19. Le realizaron tratamiento: Si  No





DATOS CLINICOS.-

LESIÓN CUTÁNEA

Fecha de inicio de la lesión: .....

Lugar donde se encontraba cuando apareció la lesión:.....

Lugar de probable contagio: .....

Número de lesiones activas:.....

Localización:.....

Número de cicatrices y localización:.....

**LESIÓN MUCOSA:**

Fecha de inicio de la lesión: .....

Lugar donde se encontraba cuando apareció la lesión:.....

Lugar de probable contagio: .....

Número de lesiones activas:.....

Localización:.....

Número de cicatrices y localización:.....

**UBICACIÓN ANATÓMICA DE LA LESIÓN**

**ANEXO 2**  
**Leishmaniasis cutanea**



Fotografía del pie derecho de un paciente con L. Cutánea  
tipo de lesión de verrugosa



Fotografía del brazo derecho de un paciente con L. Cutanea .  
Tipo de Lesión ulcerativo

ANEXO 3

FOTOGRAFÍAS DE LEISHMANIASIS MUCOSA



Fotografía de un paciente con L. Mucosa visto de perfil

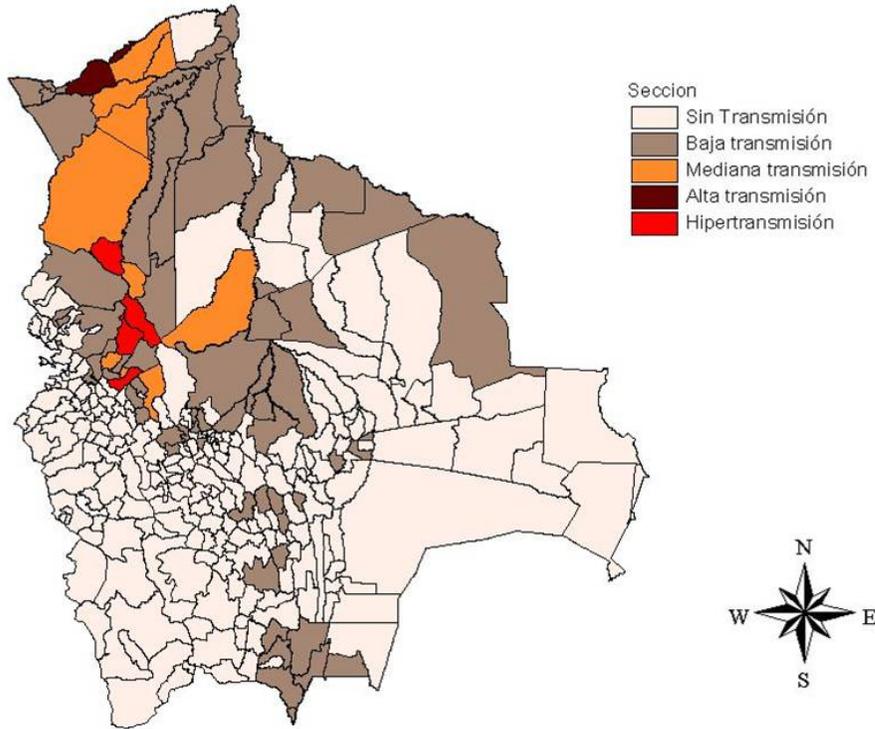


**ANEXO 4**  
**MAPA DE BOLIVIA INDICANDO EL AREA DE ESTUDIO**



## ANEXO 5

Programa Nacional de Leishmaniasis  
Mapa Epidemiológico por Municipios y Niveles de Riesgo  
Bolivia - 2004



## ANEXO 6

### PBS 0.1 M

Na Cl                    2.33g

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> anhidro   5.68g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro    1.89g

o

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro   1.78g

Levar a pH 7.2 .Enrasar a 1000 mL .

Para usar diluir 1/10 .



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y  
BIOQUIMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA



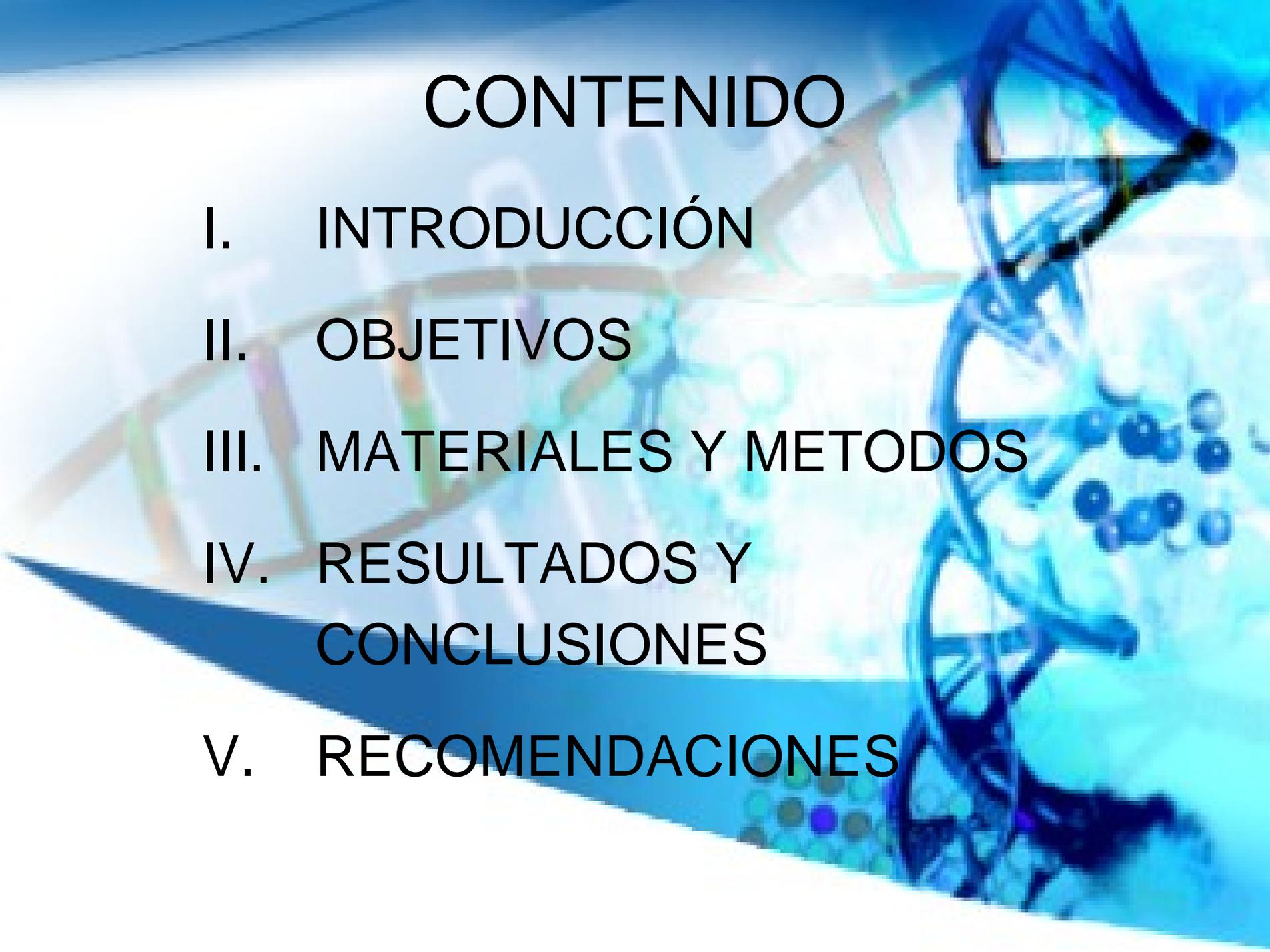
**“APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA EN EL DIAGNOSTICO Y EVALUACIÓN  
DE TRATAMIENTO CON GLUCANTIME EN  
PACIENTES CON LEISHMANIASIS DE LA  
LOCALIDAD DE RURRENABAQUE”**

**POSTULANTE: VIVIANA PERALTA CHAMBI**

**ASESORA: SUSANA REVOLLO Ph. D.**

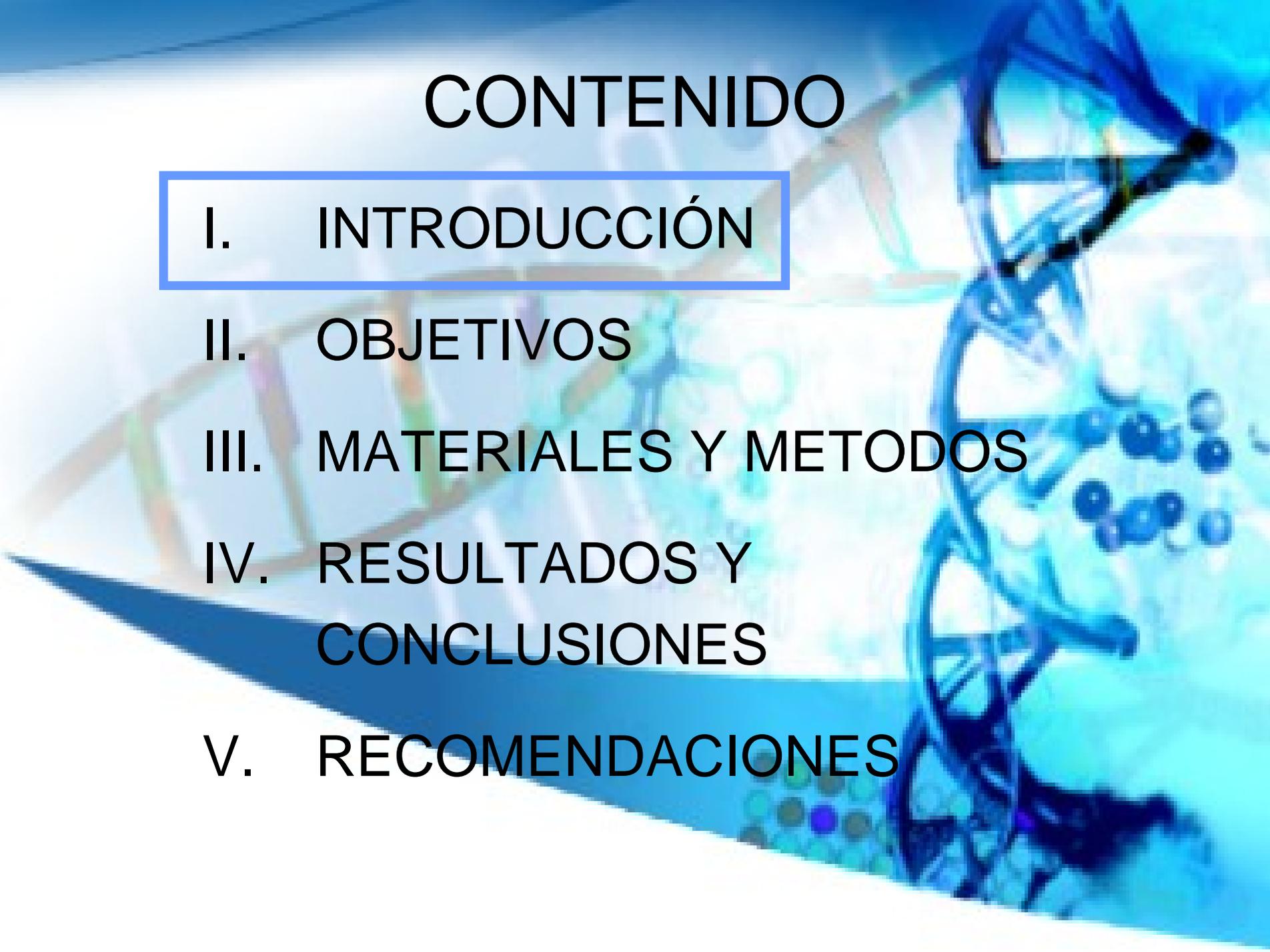
**La Paz – Bolivia  
2007**

# CONTENIDO

The background of the slide features a stylized DNA double helix structure. The left side shows a portion of the helix with orange and green rungs, while the right side is a more complex, blue-toned structure with various colored spheres (blue, purple, green) representing atoms or molecules. The overall color scheme is light blue and white.

- I. INTRODUCCIÓN
- II. OBJETIVOS
- III. MATERIALES Y METODOS
- IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES
- V. RECOMENDACIONES

# CONTENIDO



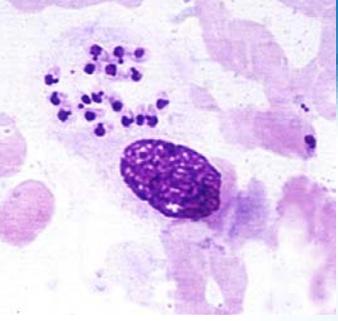
I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

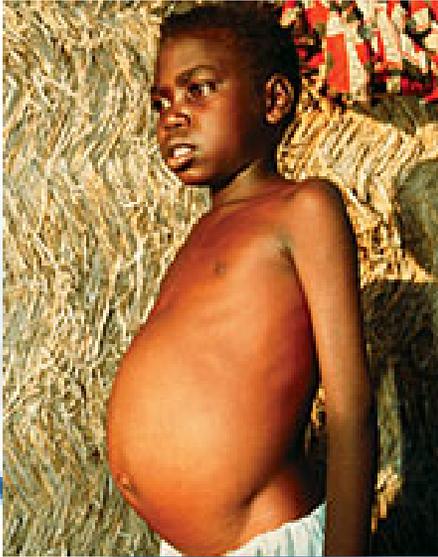
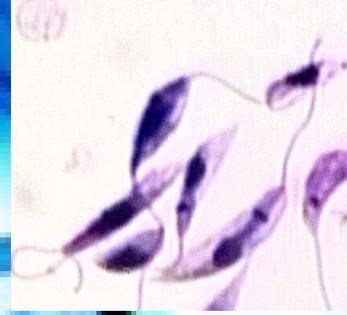
III. MATERIALES Y METODOS

IV. RESULTADOS Y  
CONCLUSIONES

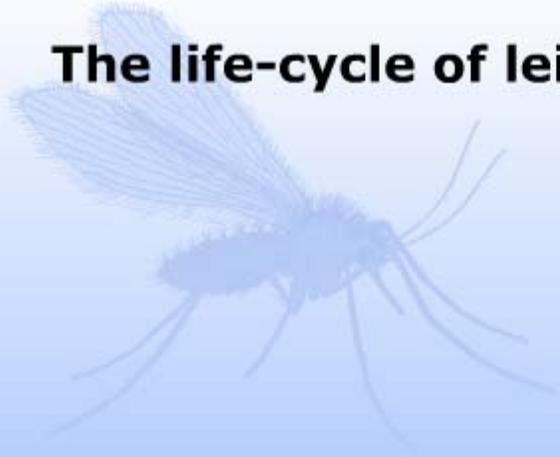
V. RECOMENDACIONES



- Los protozoos del género *Leishmania* causan un grupo de enfermedades denominadas Leishmaniasis.



## The life-cycle of leishmaniasis in humans



click to play 

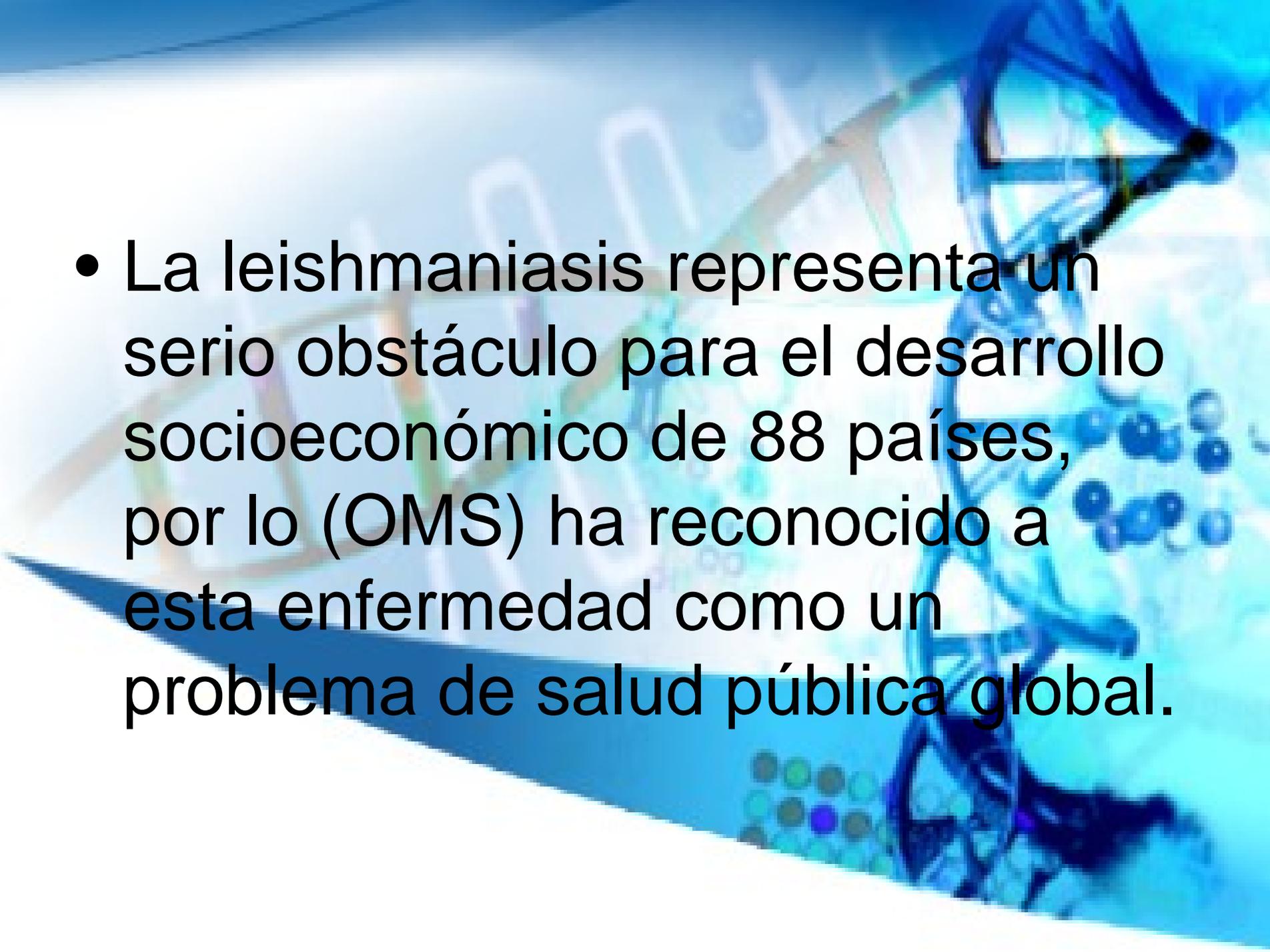
## SUBGENUS LEISHMANIA

Species	Clinical Syndrome	Geographic Distribution
<i>L. Donovanii (complex)</i>	VL (PKDL, OWCL)	China, Indian subcontinent, southwestern Asia, Ethiopia, Kenya, Sudan; possibly sporadic in sub-Saharan Africa
<i>L. infantum</i>	VL (OWCL)	China, central and southwestern Asia, Middle East, southern Europe, North Africa, Ethiopia, Sudan; sporadic in sub-Saharan Africa
<i>L. chagasi</i>	VL (NWCL)	Central and South America
<i>L. Mexicana (complex)</i>	NWCL (DCL)	Texas, Mexico, Central and South America
<i>L. amazonensis</i>	NWCL (ML, DCL, VL)	Panama and South America
<i>L. tropica</i>	OWCL (VL)	Central Asia, India, southwestern Asia, Middle East, Turkey, Greece, North Africa, Ethiopia, Kenya, Namibia
<i>L. major</i>	OWCL	Central Asia, India, southwestern Asia, Middle East, Turkey, North Africa, Sahel region of north-central Africa, Ethiopia, Sudan, Kenya
<i>L. aethiopica</i>	OWCL (DCL)	Ethiopia, Kenya

## SUBGENUS VIANNIA

<i>L. (V.) braziliensis</i>	NWCL (ML)	Central and South America
<i>L. (V.) guyanensis</i>	NWCL (ML)	South America
<i>L. (V.) panamensis</i>	NWCL (ML)	Central America, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru
<i>L. (V.) peruviana</i>	NWCL	Peru (western slopes of Andes)

Abbreviations: VL, visceral leishmaniasis; PKDL, post-kala-azar dermal leishmaniasis; OWCL, Old World cutaneous leishmaniasis; NWCL, New World (American) cutaneous leishmaniasis; DCL, diffuse cutaneous leishmaniasis; ML, mucosal leishmaniasis. Clinical syndromes less frequently associated with the various species are shown in parentheses.

- 
- La leishmaniasis representa un serio obstáculo para el desarrollo socioeconómico de 88 países, por lo (OMS) ha reconocido a esta enfermedad como un problema de salud pública global.

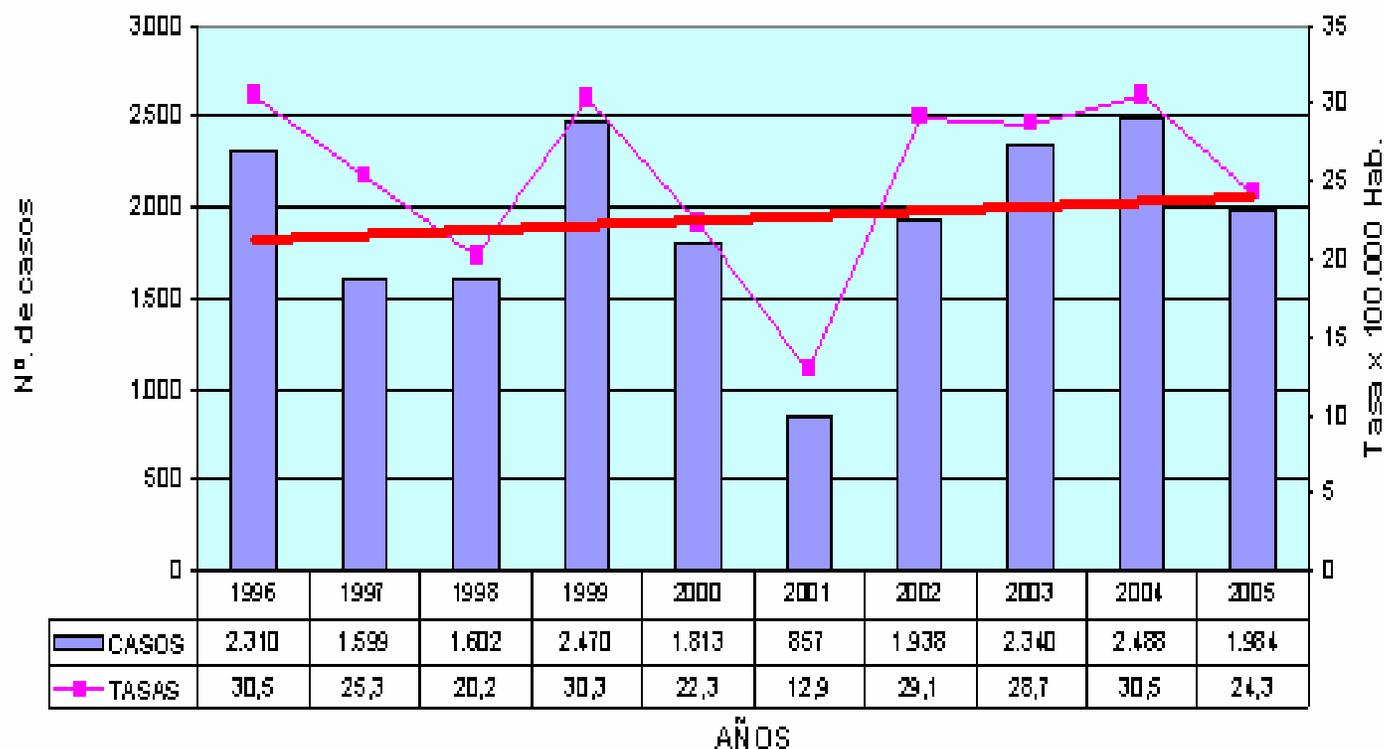
# Estado Global



# En Bolivia la tasa de incidencia es 23.4 por 100.000 habitantes

## TENDENCIA SECULAR Y TASA DE INCIDENCIA DE LA LEISHMANIASIS

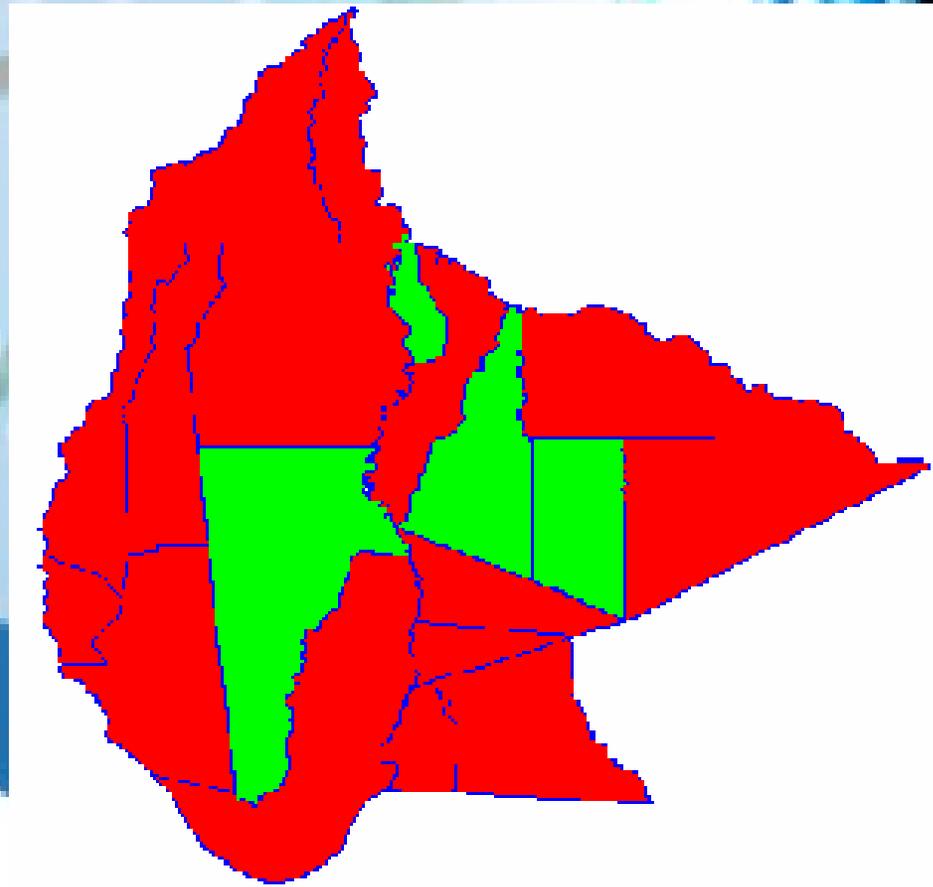
BOLIVIA GESTION 1996 AL 2005



•Fuente: MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES

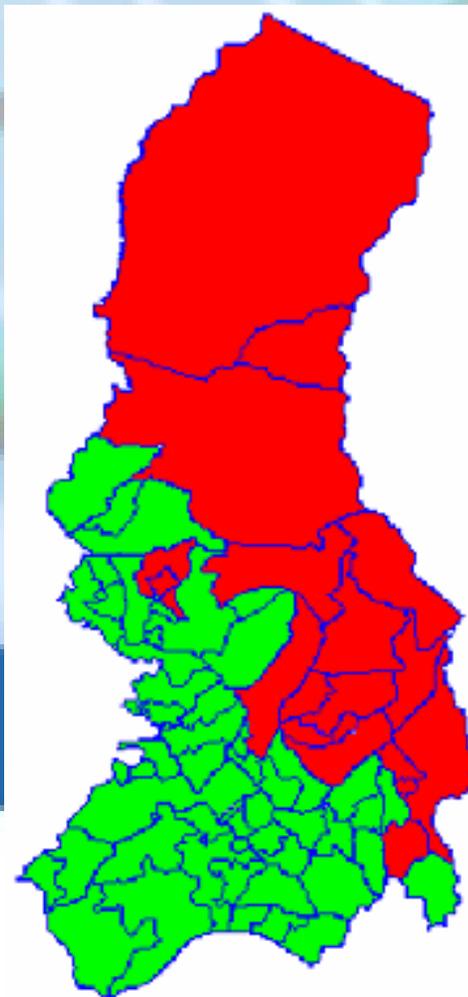
# SITUACION EPIDEMIOLÓGICA DE BENI POR MUNICIPIOS

MUNICIPIOS	TASA
Trinidad	11,2
Riberalta	18,2
Guayaramerin	6,0
Reyes	10,8
Baures	9,3
Exaltación	3,3
Magdalena	11,2
San Andrés	3,5
Santa Rosa	3,1
San Juaquin	20,1
San Borja	17,4
Loreto	25,3
Rurrenabaque	57,0
San Ignacio	50,8



# SITUACION EPIDEMIOLÓGICA DE LA PAZ POR MUNICIPIOS

MUNICIPIOS	TASAS
Guanay	14,1
Apolo	41,2
Inquisivi	60,0
Irupana	333,3
Palos Blancos	214,2
Ixiamas	71,4
San Buenaventura	190,3
Caranavi	476,3
Chulumani	53,2
Yanacachi	13,6
Cajuata	37,6
La Asunta	14,4
Coroico	77,8



MUNICIPIOS	TASAS
La Paz	1,0
Ayata	16,0
Aucapata	2,3
Combaya	3,8
Quime	1,3
Coripata	37,6
Ichoca	4,2

# TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS

- El tratamiento de primera elección para las diferentes formas de leishmaniasis, recomendado por la OPS/OMS, es el uso de antimoniales pentavalentes, a dosis adecuadas por un tiempo adecuado.
- **Glucantime**
- **Presentación: Ampolla inyectable de 5 ml (425 mg de antimonial pentavalente).**

# Modo de empleo y posología:



- **Cutánea:**

**Dosis diaria: 20 mg./kg. Peso.**

**Duración del tratamiento: 20 días imprescindible.**

- **Mucosa y Visceral:**

**Dosis diaria: 20 mg./kg. Peso.**

**Duración del tratamiento: 30 días imprescindible.**

- **Vía de administración: Intramuscular (en una sola jeringa).**

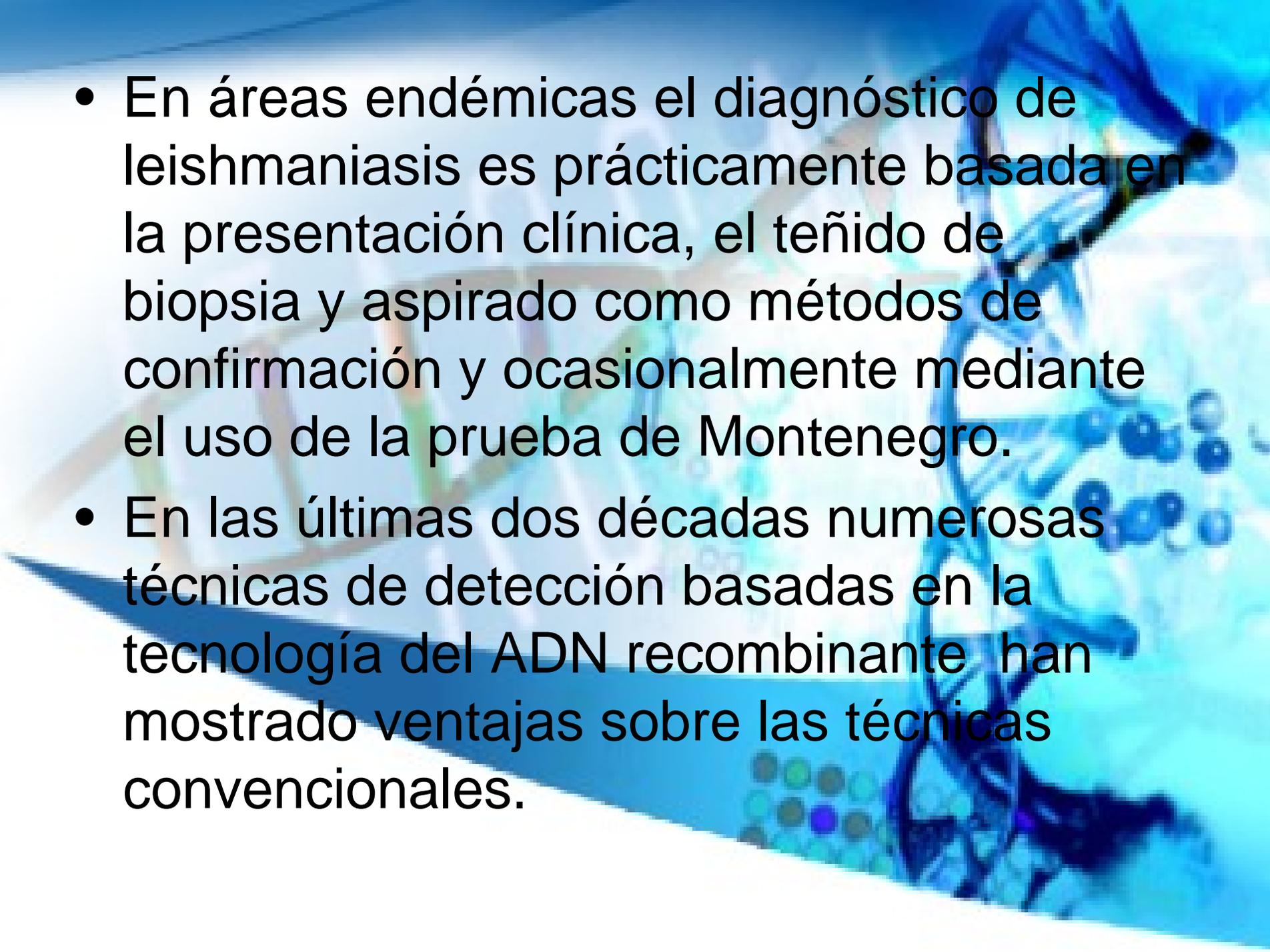
**La inhibición de la biosíntesis de energía en los amastigotes pareciera parte del mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes.**



De acuerdo con las normas del Ministerio de Salud antes de iniciar el tratamiento, todo paciente deberá tener:

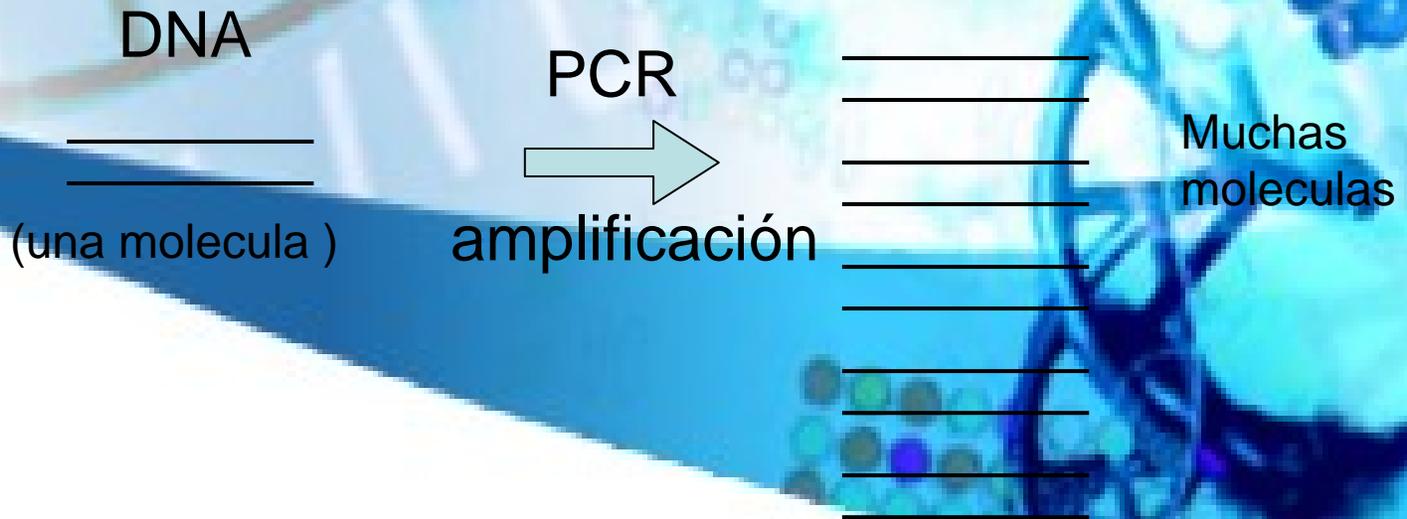
Diagnóstico parasitológico y evaluarse clínicamente para descartar alteraciones cardiacas o renales. Si hay medios disponibles, a los mayores de 50 años y a quienes se les detecten alteraciones clínicas, deberá practicárseles los exámenes paraclínicos correspondientes, incluyendo electrocardiograma, pruebas de función renal y hepática.



- 
- The background of the slide features a blue-toned image of a DNA double helix structure on the right side, and a blurred image of a microscope on the left side. The overall theme is scientific and medical.
- En áreas endémicas el diagnóstico de leishmaniasis es prácticamente basada en la presentación clínica, el teñido de biopsia y aspirado como métodos de confirmación y ocasionalmente mediante el uso de la prueba de Montenegro.
  - En las últimas dos décadas numerosas técnicas de detección basadas en la tecnología del ADN recombinante han mostrado ventajas sobre las técnicas convencionales.

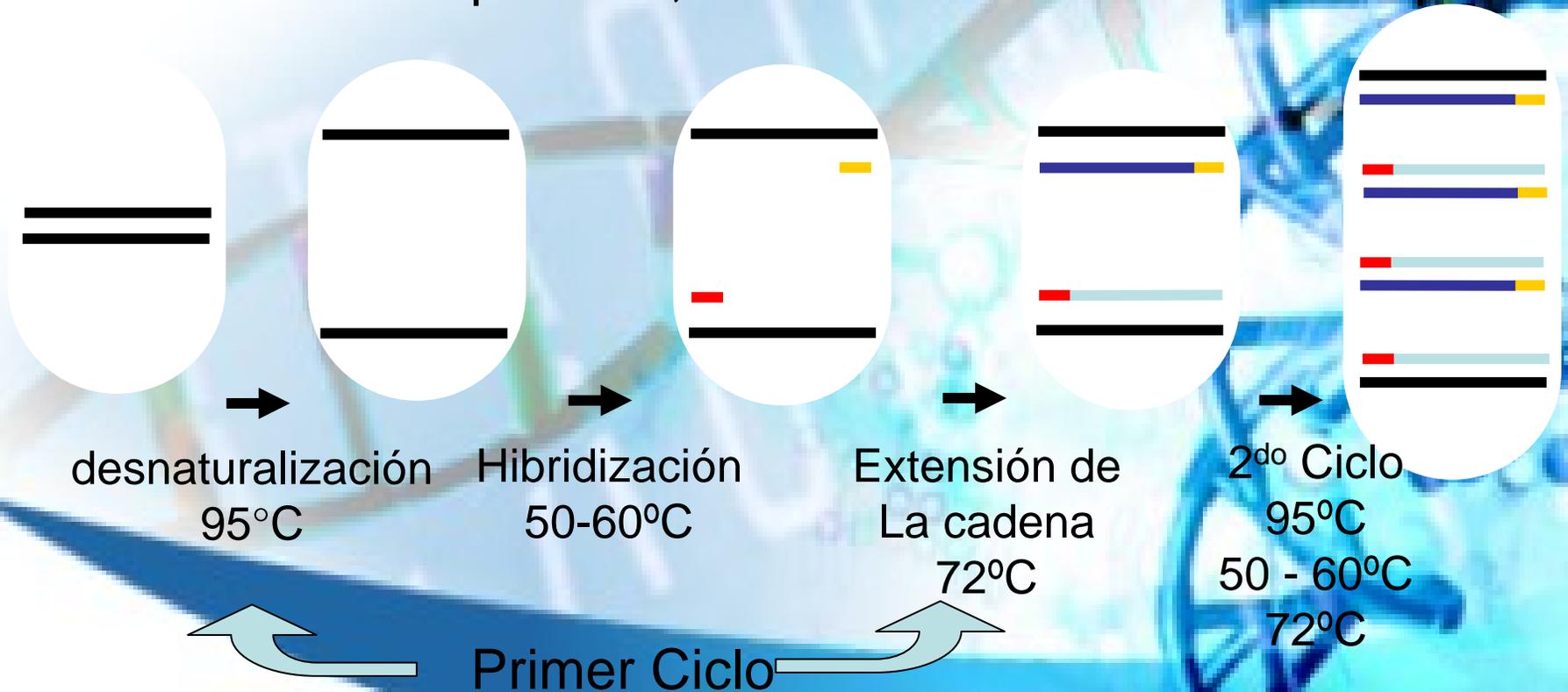
# Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

PCR es básicamente una técnica de amplificación del DNA.



# Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

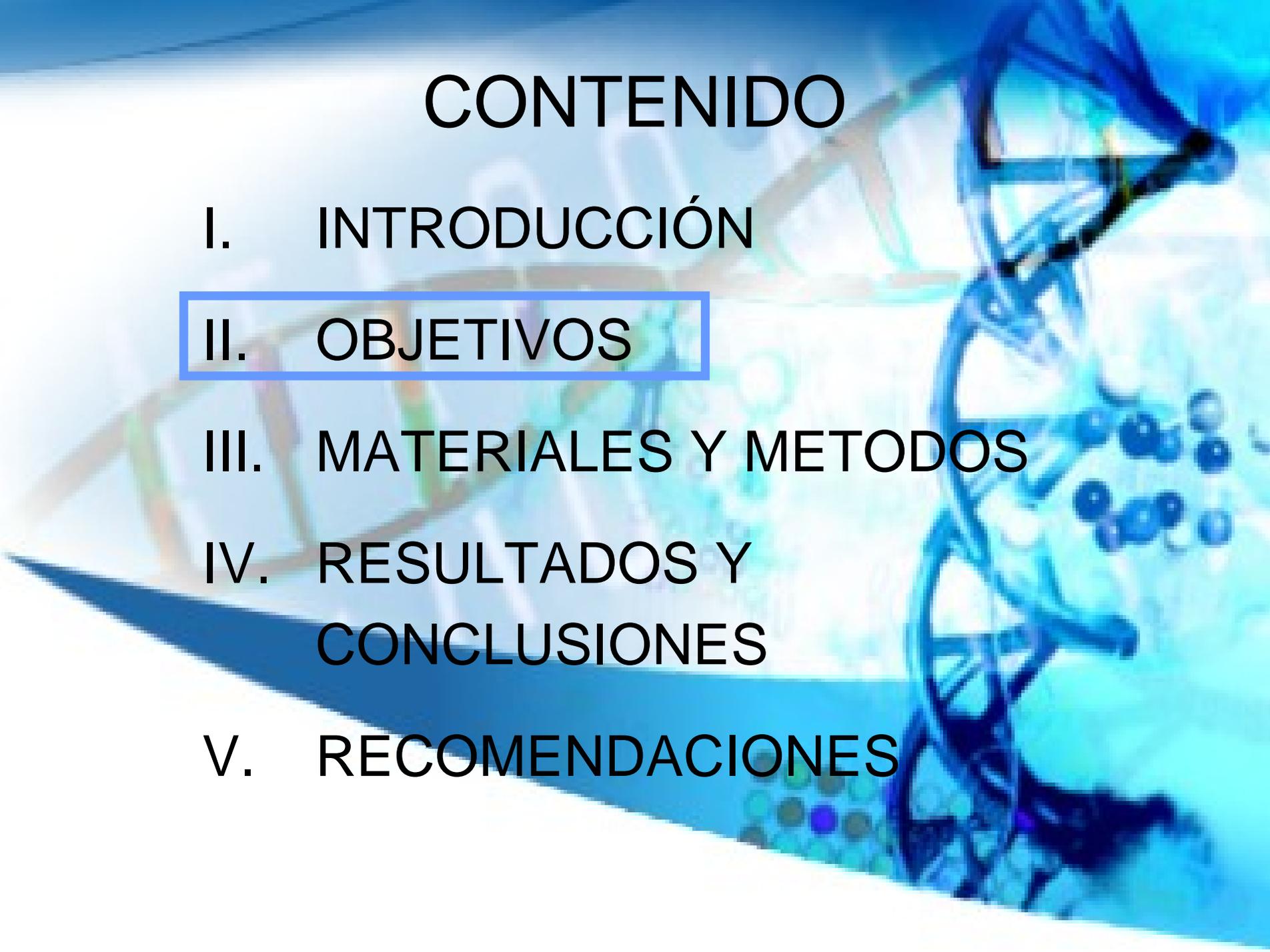
Para controlar el proceso, necesitamos controlar la temperatura



Si repetimos el ciclo, tendremos cuatro copias

Múltiples ciclos darán un incremento exponencial en el número de copias

# CONTENIDO



I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS

IV. RESULTADOS Y  
CONCLUSIONES

V. RECOMENDACIONES

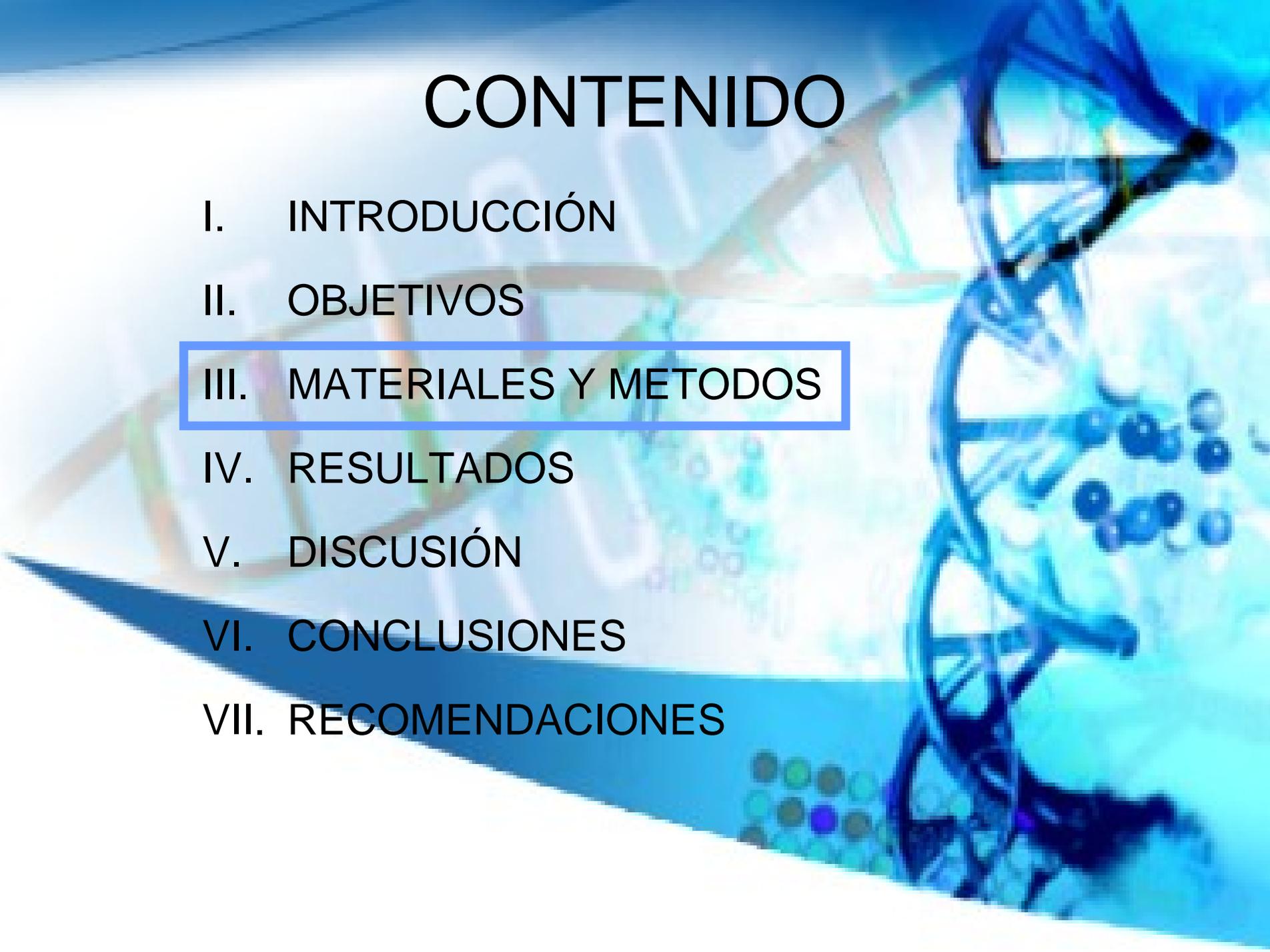
## A.OBJETIVO GENERAL

- Aplicar la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico y evaluación de tratamiento con glucantime en pacientes con leishmaniasis de la localidad de Rurrenabaque

## B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el diagnóstico de la leishmaniasis por métodos convencionales en pacientes de la localidad de Rurrenabaque con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis.
- Determinar la presencia de *Leishmania sp.* a través de la amplificación de ADN en raspados, infiltrados de lesiones, sangre total de pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis.
- Realizar el seguimiento del tratamiento con glucantime al finalizar el tratamiento al mes del y a los seis meses de finalizado el tratamiento.

# CONTENIDO



I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS

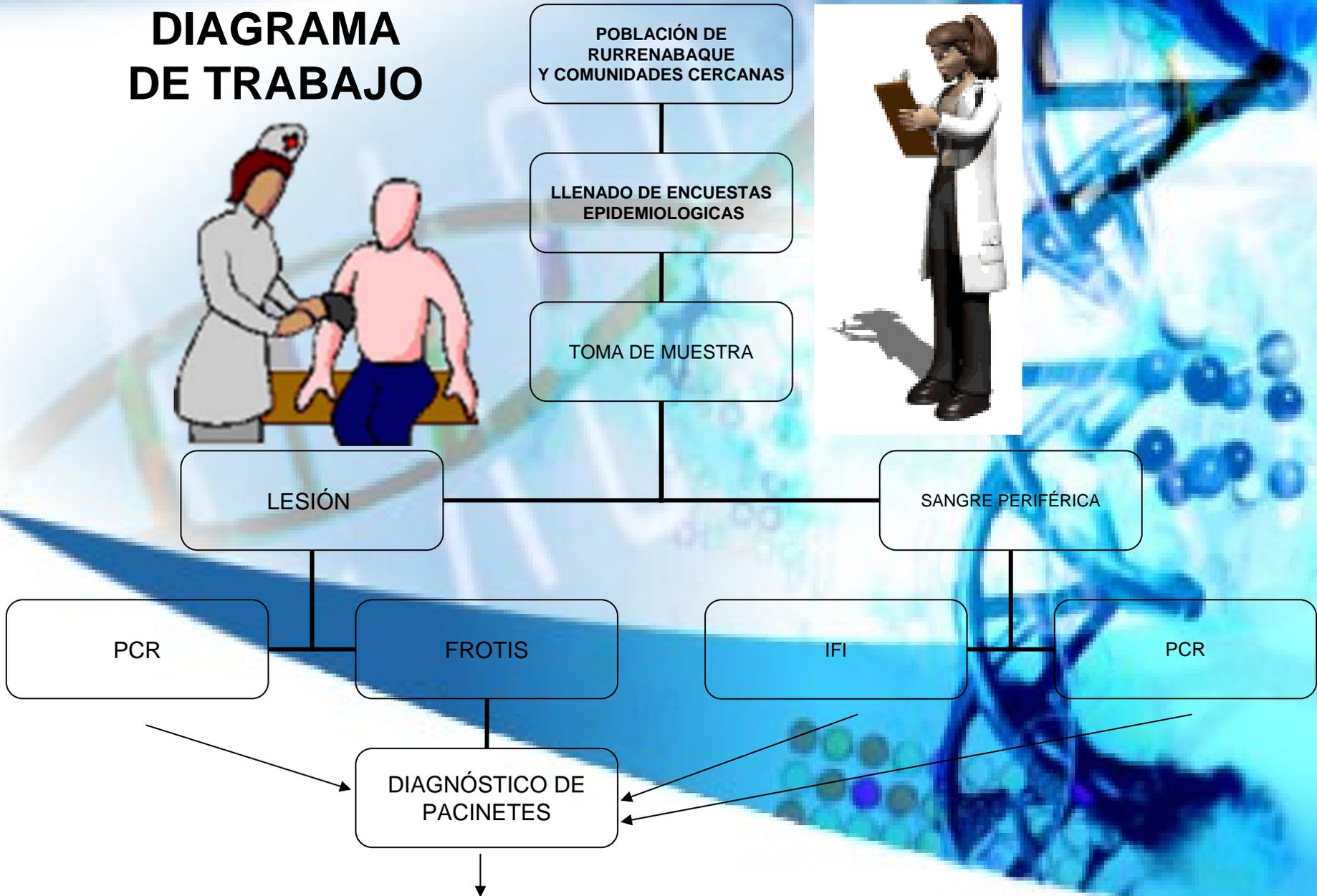
IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. RECOMENDACIONES

# DIAGRAMA DE TRABAJO





Entrega de resultados

Análisis de la salud de los  
pacientes con leishmaniasis por  
el equipo multidisciplinario

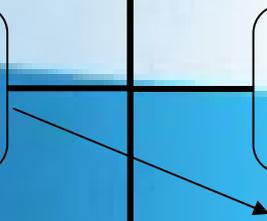
Inicio de tratamiento  
con glucantime

Evaluación a T1

Evaluación a T2

Evaluación a T3

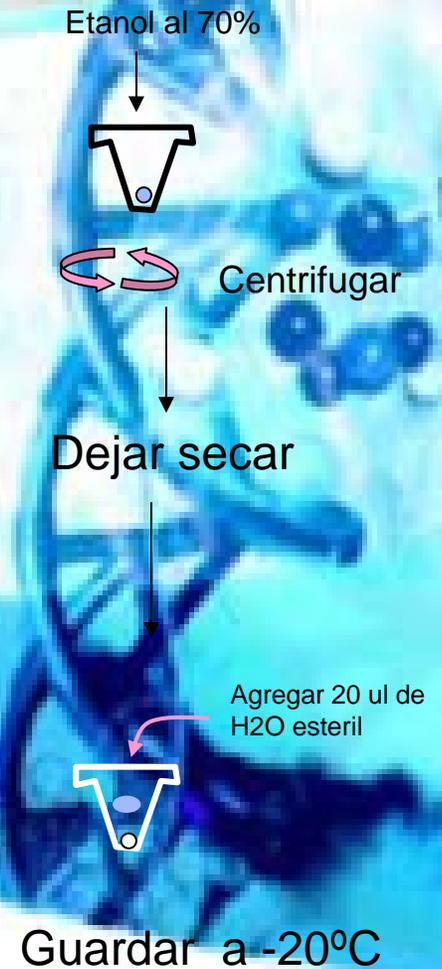
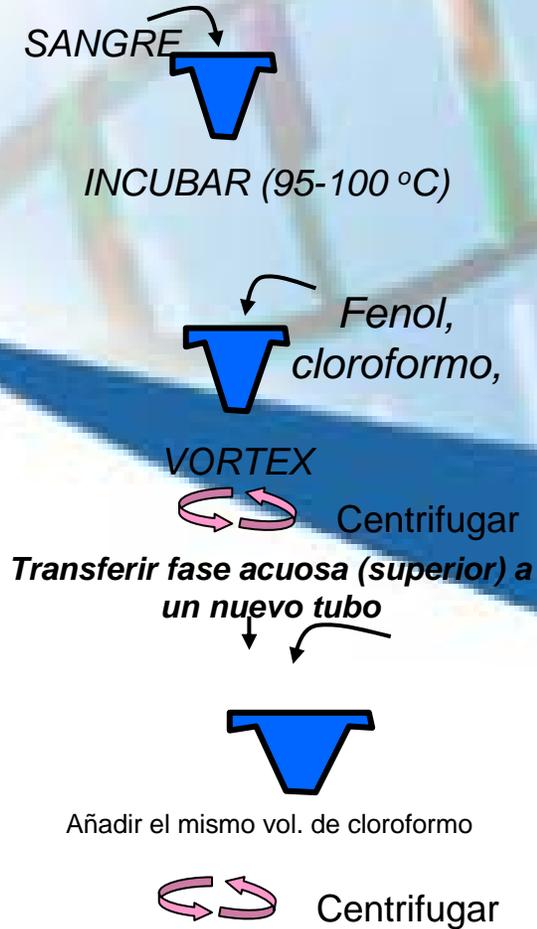
ANALISIS DE RESULTADOS



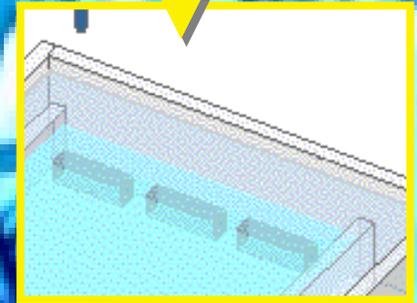
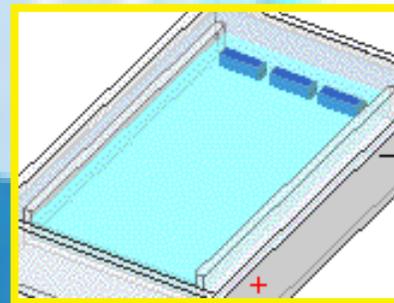
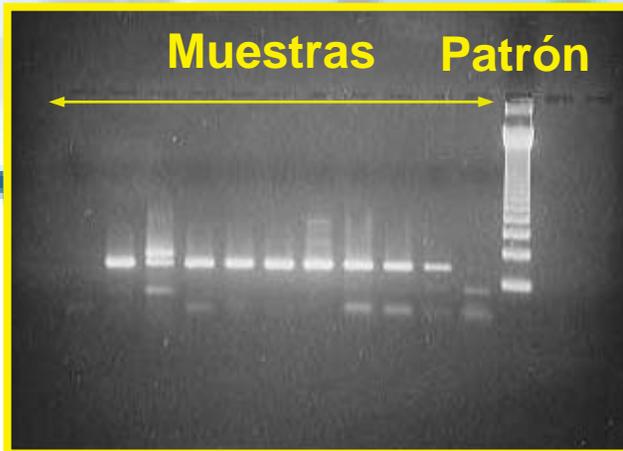
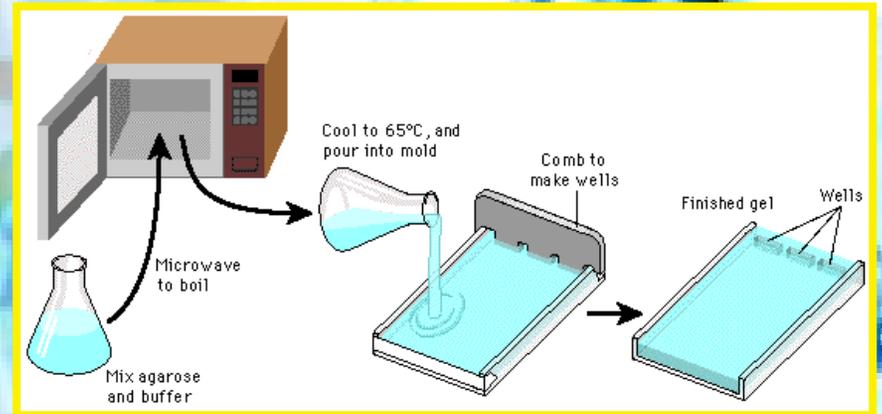
# MASTER MIX

Reactivos	[C] inicial	[C] Final	Vol /tubo ul	Vol/total ul
Buffer	10x	1x	1.25	8.75
dNTPs	5mM	0,2 mM	0.5	3.5
Primer 13A	10 uM	1.0 uM	1.25	8.75
Primer 13B	10 uM	1.0 uM	1.25	8.75
Mg Cl <sub>2</sub>	25 mM	2.0 mM	1.0	7.0
Taq	5 UI/ml	0.125 UI/ml	0,0625	0.4375
H <sub>2</sub> Odd	-----	-----	4.5625	31.9375
DTT	100 mM	1 mM	0,125	0.875

# Extracción de ADN



# ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA



# Amplificación



Desnaturalización inicial

94°C

3 minutos

Desnaturalización  
Templado  
Elongación

94° C

54 °C

72 °C

1 minuto

1 minuto

1 minuto

35 ciclos

Extensión final  
Conservación:

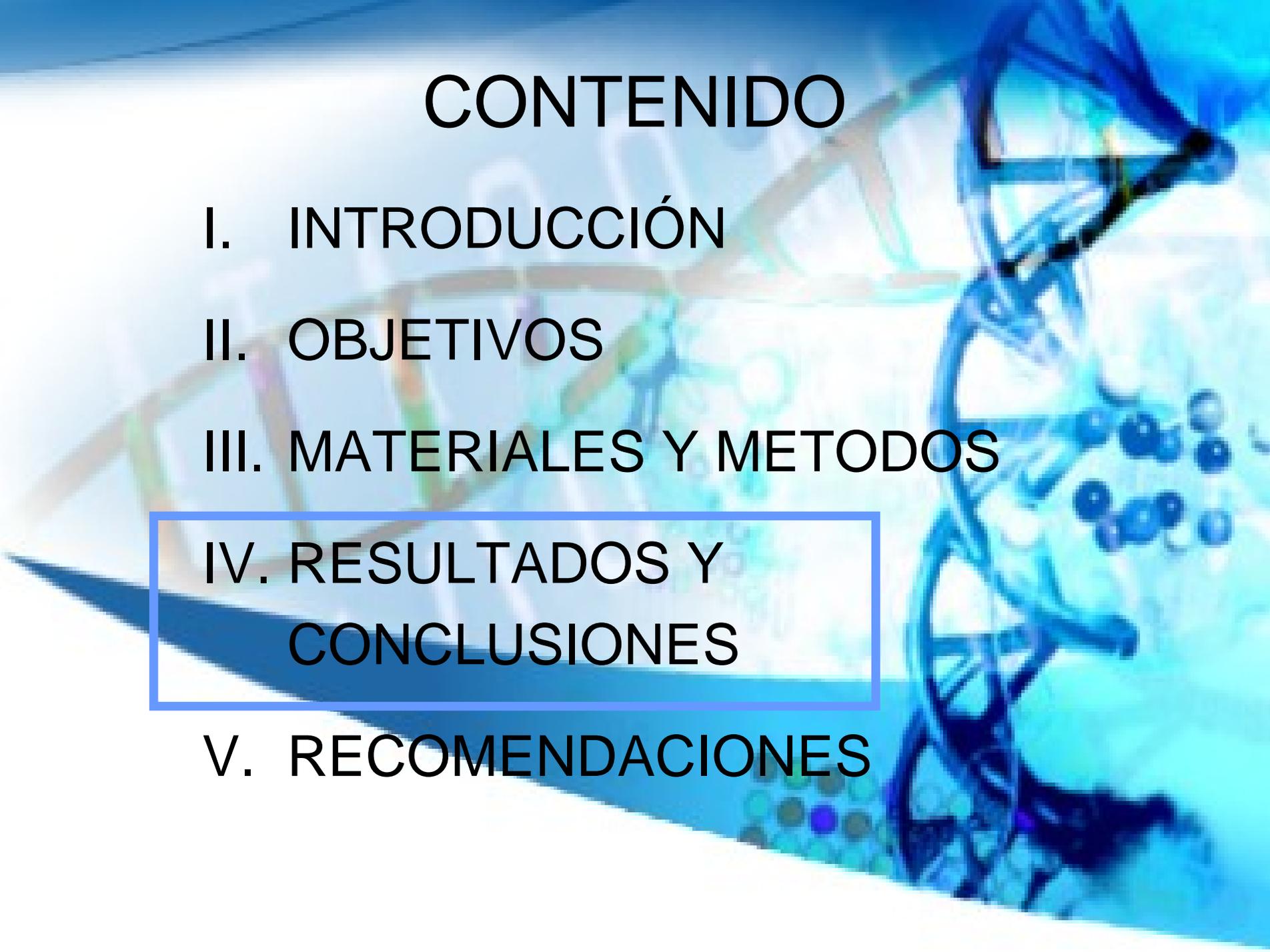
72 °C

4 °C

10 minutos

tiempo indefinido

# CONTENIDO



I. INTRODUCCIÓN

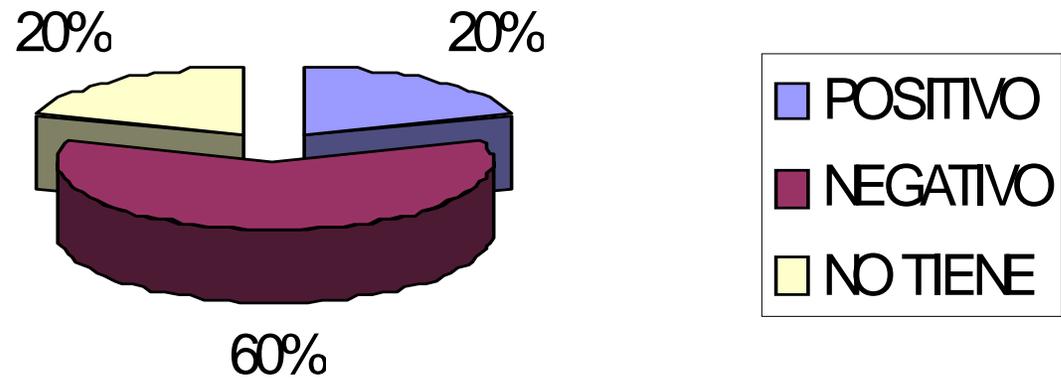
II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS

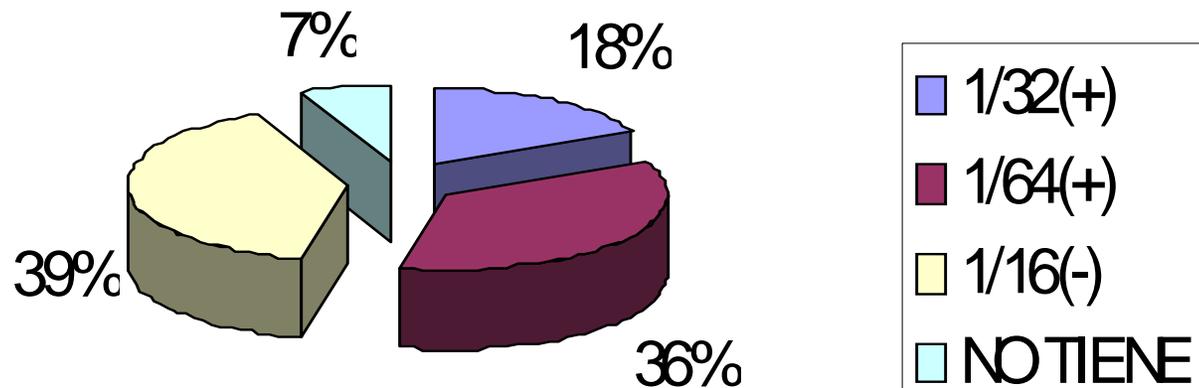
IV. RESULTADOS Y  
CONCLUSIONES

V. RECOMENDACIONES

## RESULTADOS DE FROTIS



# RESULTADOS DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA



# Productos de amplificación de PCR

- 1 (Control negativo )
- 2 (*L. amazonensis* PH8),
- 3(*L. braziliensis* M 2903),
- 4(*L.donovani* PP75)
- 5 (M1), 6 (M2), 7 (Marcador),
- 8(M3), 9 (M 4), 10 (M5),
- 11 (M6).

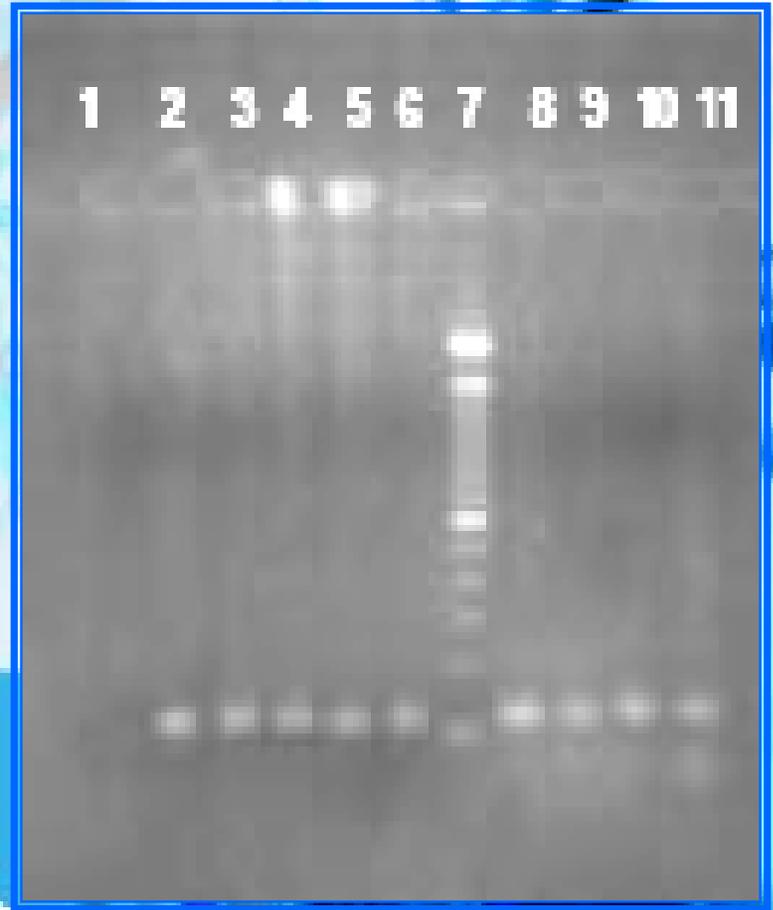
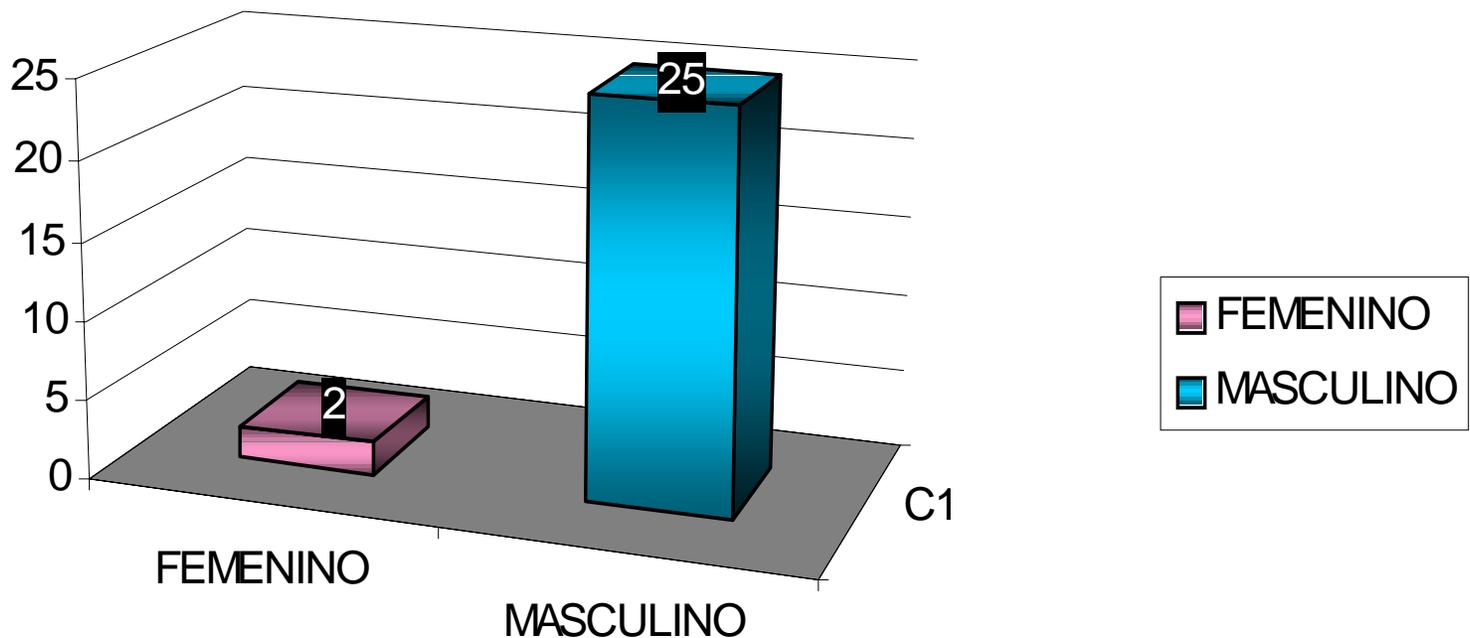


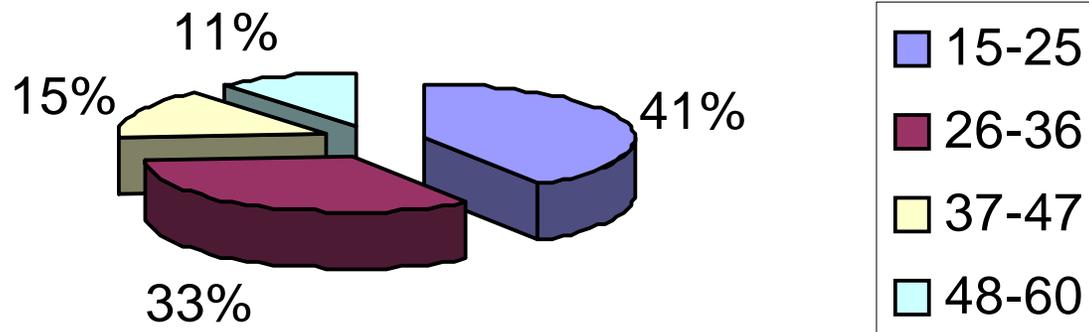
Foto No. 1

# ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN EVALUADA A T1, T2 Y T3 MEDIANTE LA PCR.

## DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGUN GÉNERO

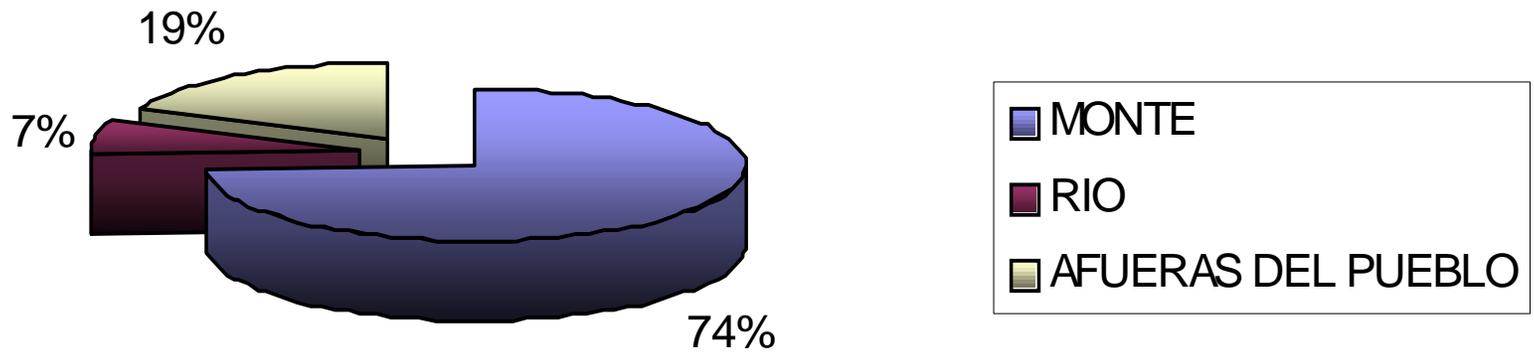


## DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGUN EDAD



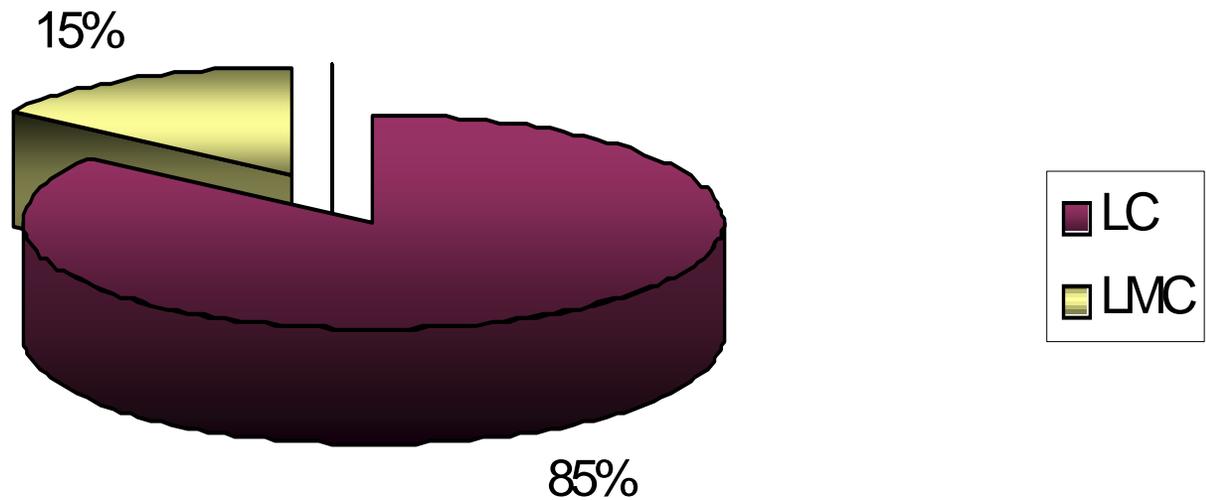
- El grupo más afectado fue el de 15-25 años

## DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN LUGAR DE PROBABLE CONTAGIO

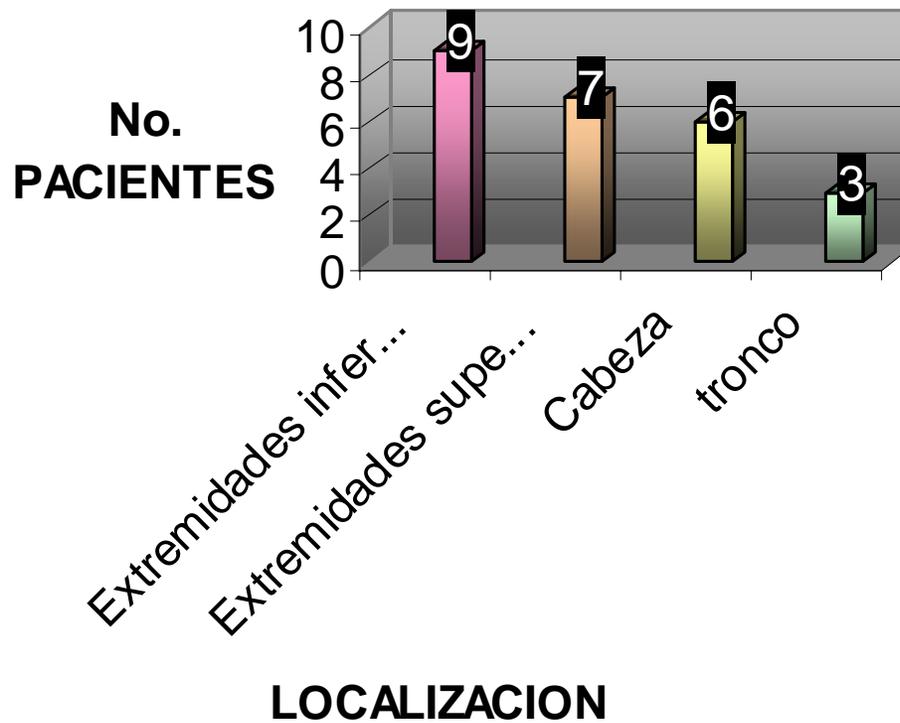


- El Monte fue el lugar de frecuencia más alta

## DISTRIBUCION DE PACIENTES SEGÚN LAS FORMAS CLINICAS DE LEISHMANIASIS



## DISTRIBUCION DE LA LOCALIZACION DE LESIONES CUTÁNEAS EN LOS PACIENTES



# Distribución de pacientes según ocupación

OCUPACION	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
AGRICULTOR	10	37,00%	37,00%
AMA DE CASA	2	7,40%	44,40%
COMERCIANTE	2	7,40%	51,90%
ESTUDIANTE	3	11,10%	63,00%
GUIA TURISTICO	2	7,40%	70,40%
OTROS	8	29,60%	100,00%
Total	27	100,00%	100,00%

- La más afectada es la de agricultor

# Distribución de pacientes según su procedencia

PROCEDENCIA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
BENI	9	33,30%	33,30%
LA PAZ	10	37,00%	70,40%
ORURO	1	3,70%	74,10%
POTOSI	1	3,70%	77,80%
SANTA CRUZ	2	7,40%	85,20%
SUCRE	4	14,80%	100,00%
Total	27	100,00%	100,00%

- La Paz y Beni tienen mayor porcentaje de afectados

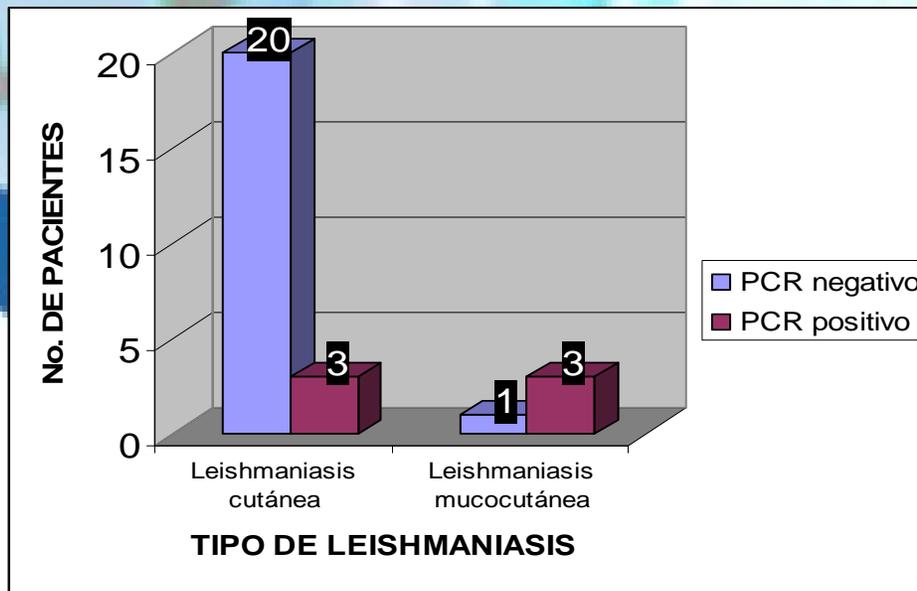
# Frecuencia de pacientes que recibieron anteriormente tratamiento con glucantime

HA RECIBIDO TRATAMIENTO	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulativo
Si	4	14,80%	14,80%
No	23	85,20%	100,00%
Total	27	100,00%	100,00%

- La mayoría no recibió tratamiento

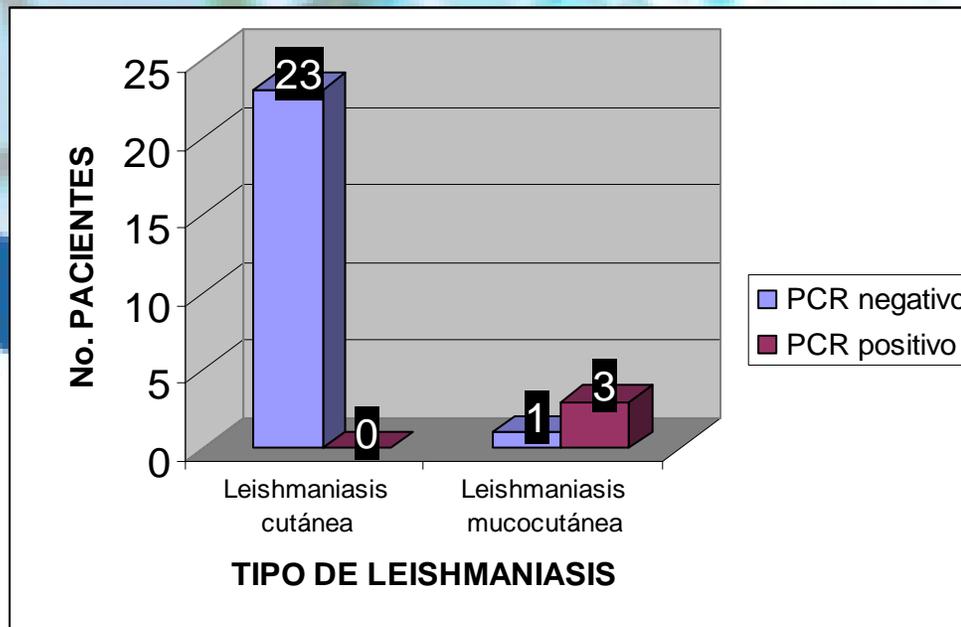
# 1. PRIMERA EVALUACIÓN

Tipo de leishmaniasis	L. cutánea	L. muco-cutánea	Total
PCR positivo	3	3	6
PCR negativo	20	1	21
Total	23	4	27

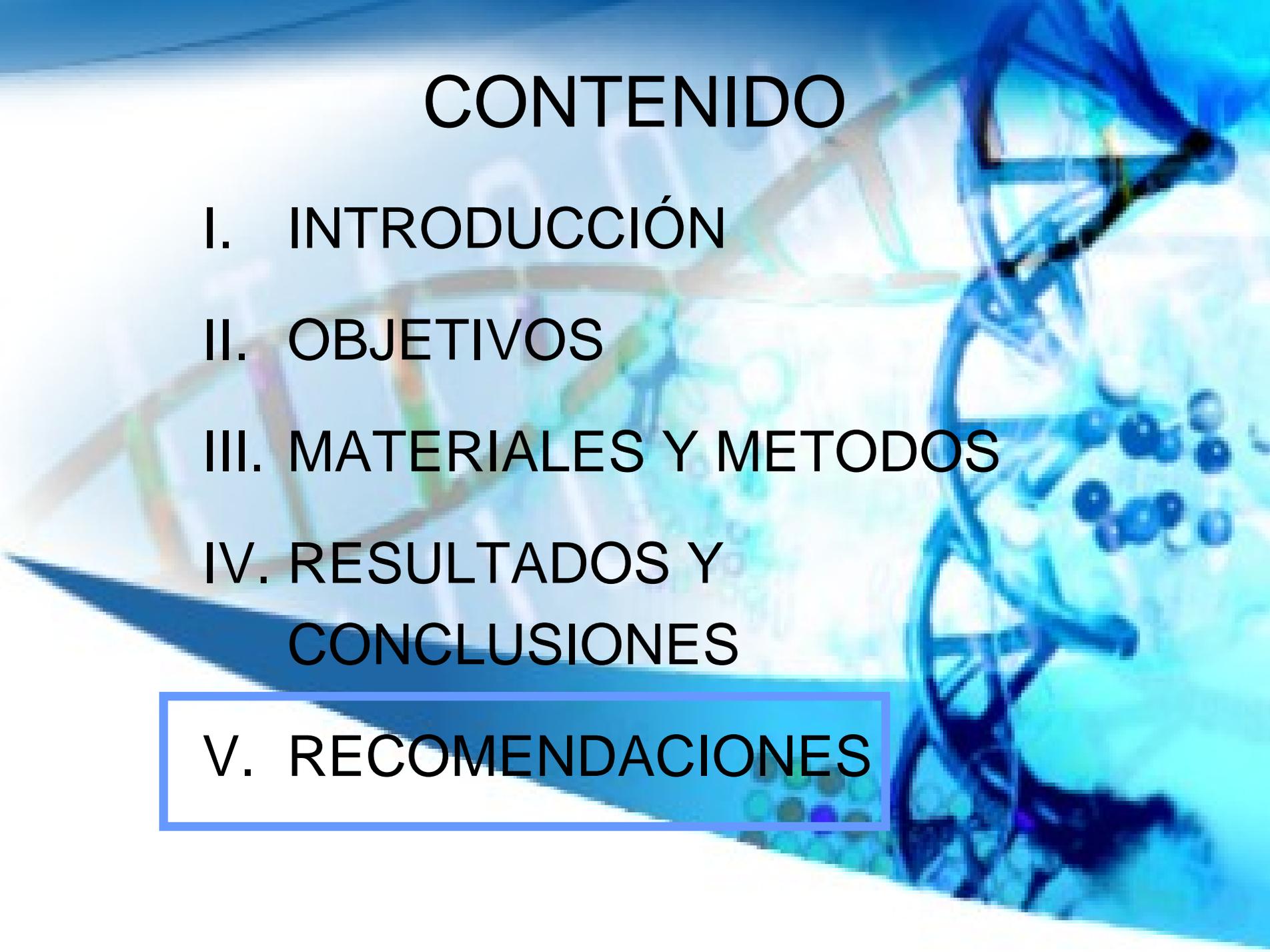


# SEGUNDA Y TERCERA EVALUACIÓN

Tipo de leishmaniasis	L. cutánea	L. muco-cutánea	total
PCR positivo	0	3	3
PCR negativo	23	1	24
Total	23	4	27



# CONTENIDO



I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS

IV. RESULTADOS Y  
CONCLUSIONES

V. RECOMENDACIONES

- Los datos obtenidos de evaluación de tratamiento deben ser solventados, con un estudio que tenga un número mayor de muestras, que sean representativos para un análisis estadístico y se pueda dar un juicio de valor aun más sólido.
- En estudios en los que se fuese a evaluar la eficacia de un tratamiento para la leishmaniasis se recomienda utilizar técnicas que ayuden a diferenciar la infección de una re infección
- El contar con el domicilio correcto de los pacientes para realizar los controles, y que estos realmente estén interesados en realizarse las evaluaciones post-tratamiento.

# Gracias

Agradecemos la colaboración de:  
Susana Castillo (PhD).

Lic. Irma Cullis

Lic. Maria Esther Chuquimia

Biotec. Maria Luz Soto

Dr. Walter Toro

Biotec. Janeth Guerrero

A todo el personal del Hospital de Rurrenabaque.  
Fundamentalmente la colaboración de los pacientes

Este trabajo fue financiado por el Proyecto  
Enfermedades Infecciosas: "Nuevas Estrategias  
Terapéuticas" de ASDI - SAREC