



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



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

LICENCIA DE USO

El usuario está autorizado a:

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

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

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

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA
CARRERA DE BIOQUIMICA



Evaluación del efecto del extracto de alcaloides totales de la *Galipea longiflora* (Krause) Evanta, sobre la actividad fagocítica de macrófagos humanos infectados con *Leishmania braziliensis*, octubre de 2010 y abril de 2011

Elaborado por:

Univ. Dennis Castro Romero

La Paz - Bolivia

2014

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA
CARRERA DE BIOQUIMICA**



Evaluación del efecto del extracto de alcaloides totales de la *Galipea longiflora* (Krause) Evanta, sobre la actividad fagocítica de macrófagos humanos infectados con *Leishmania braziliensis*, octubre de 2010 y abril de 2011

**Tesis realizada para optar por la Licenciatura en la Carrera de
Bioquímica**

Elaborado por:

Univ. Dennis Castro Romero

Asesora:

Dra. Jacqueline Calla de Magariños MSc, PhD.

La Paz - Bolivia

2014



A mi amada mamita Mimy, que con su inmenso amor, cariño, comprensión y cuidados mil, ha sabido enseñarme siempre el buen camino, la excelencia y la dedicación, con responsabilidad y esmero en la vida.

A mi amada esposa Patricia, por su apoyo en los buenos y malos momentos y por darme mis tres hermosos hijos Oriana, Daniela y Diego, que son la razón más bella para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS), que mediante el apoyo de los grandes profesionales que lo integran, me permitieron realizar el presente trabajo.

Al proyecto “Enfermedades Infecciosas” ASDI-SAREC, por el financiamiento de equipos y reactivos para el desarrollo de la presente tesis.

A los pacientes del Hospital de Palos Blancos – Departamento de Parasitología-Leishmaniasis – La Paz Bolivia, sin quienes este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Jacqueline Calla de Magariños, excelente profesional que con su infinita paciencia, constante apoyo y orientación sin igual, llegó a ser una luz en el camino, en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Walter Magariños, por su templanza y sabiduría en momentos de desasosiego, siendo un ejemplo de vida, que me enseñó a valorar cada esfuerzo realizado para el desarrollo de un trabajo investigación.

Al Dr. Edgar Teddy Quispe Soto, por ser mí mentor y guía, con su colaboración, orientación y amistad durante el tiempo que trabajamos juntos.

Al Dr. Rolando Sánchez Montaña (BIOROL), porque en el tiempo que he llegado a conocerle, ha sido más que un incomparable docente, y un verdadero amigo, sino más bien un padre.

Al Dr. Walter Montaña, por su apoyo incondicional y consejo en todo momento, que me permitió llegar a instancias del Instituto para poder realizar este trabajo de investigación.

A las Dras. Ruth, Wendy, Carlita, Fabiola, Claudia, Karina, que conforman el inigualable grupo de trabajo y amistad del Laboratorio de Inmunología del Instituto, por su grata amistad brindada.

RESUMEN

Durante el proceso de infección natural, *Leishmania* toma contacto con una variedad de fagocitos mononucleares en los diferentes tejidos incluyendo macrófagos residentes y monocitos que se dirigen hacia el sitio de infección desde la circulación sanguínea, en este trabajo utilizamos macrófagos humanos obtenidos a partir de células mononucleares de sangre periférica, en un sistema *in vitro*, y posteriormente infectados con promastigotes de *Leishmania braziliensis*, con la administración, en dos etapas, del extracto de alcaloides de *Galipea longiflora* (Krause) Evanta, una especie medicinal.

En la primera, la capacidad infectiva presentó un decremento (19.23%), observándose que los efectos sobre la actividad fagocítica de los macrófagos hallados no eran suficientemente claros, pues no concordaban con los resultados del análisis del índice de infección que indicaba que el comportamiento de las células tratadas versus el control no llegaron a presentar una diferencia estadística significativa ($P < 0.01$), que llevó a tomar en cuenta la presencia intrínseca de la actividad antiparasitaria del extracto.

En la segunda etapa, con el pretratamiento del extracto de alcaloides de Evanta, antes de la infección, la capacidad infectiva presentó un notable incremento (43.79%), con una diferencia estadística altamente significativa ($P > 0.01$) respecto al control, sugiriendo una capacidad infectiva facilitada de los promastigotes, o una actividad fagocítica mejorada, afirmación que fue corroborada por el análisis del índice de infectividad que presentó un comportamiento distinto al control con diferencias estadísticas altamente significativas ($P > 0.01$), además del análisis de las diferencias de las frecuencias relativas en el transcurso del tiempo, que presentó a la primera etapa con un valor

del 63.15% y a la segunda con 65.9%, comportamiento que fue diferente al control (41.37%), que presentó una actividad fagocítica ineficaz, que podría estar relacionada con la exacerbación del daño del tejido, así como con la cronicidad de la enfermedad.



ÍNDICE

RESUMEN

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO TEÓRICO	5
2.1 Leishmaniasis.....	5
2.2 Clasificación.....	6
2.3 Vector.....	7
2.4 Biología Molecular y Bioquímica de Leishmania.....	7
2.4.1 Kinetoplasto.....	7
2.4.2 Genoma.....	8
2.4.3 Regulación de la expresión génica en Leishmania.....	9
2.5 Metabolismo.....	9
2.5.1 Tráfico de hemo.....	10
2.6 Componentes de la membrana de Leishmania.....	11
2.6.1 Lipofosfoglicanos.....	15
2.7 Ciclo de vida de Leishmania.....	17
2.7.1 Establecimiento y mantenimiento de la infección.....	18
2.8 Respuesta inmunitaria.....	22
2.8.1 La respuesta a las infecciones puede ser innata o adaptativa.....	22
2.8.2 Las defensas internas inespecíficas implican procesos químicos celulares y coordinados.....	23
2.8.3 Los fagocitos constituyen una importante defensa inespecífica contra los patógenos.....	23
2.8.3.1 Fagocitos.....	24
2.8.3.1.1 Granulocitos.....	27
2.8.3.1.2 Monocitos.....	27
2.8.3.1.3 Histiocitos y macrófagos.....	27
2.8.4 Reacción inmune en Leishmaniasis.....	28
2.8.4.1 Fagocitosis mediada por receptor.....	30
2.8.4.2 Papel de la fosfatidilserina en la infectividad de Leishmania sp.....	30
2.8.4.3 Participación de las células TCD4+ en la Leishmaniasis.....	32
2.8.4.4 Participación de las células TCD8+ en la Leishmaniasis.....	34
2.8.4.4.1 Vías de activación de las células TCD8+ en la Leishmaniasis.....	35
2.8.4.4.2 Función efectora de las células TCD8+.....	37
2.9 Galipea longiflora Krause (Evanta).....	39
2.9.1 Medicina tradicional.....	39

3.- ANTECEDENTES	40
3.1 Estudios Científicos.....	40
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
5.- JUSTIFICACIÓN	47
6.- OBJETIVOS	49
6.1 Objetivo general.....	49
6.2 Objetivos específicos.....	49
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	50
7.1 Diseño o tipo de estudio	50
7.2 Lugar de estudio	50
7.3 Materiales.....	50
7.3.1 Equipos.....	50
7.3.2 Reactivos.....	50
7.4 Material biológico.....	51
7.5 Métodos.....	51
7.5.1 Criterios de inclusión para la delimitación del universo.....	51
7.5.2 Criterios de exclusión para la delimitación del universo.....	52
7.6 Aislamiento y preparación de macrófagos.....	52
7.6.1 Cultivo celular de macrófagos.....	52
7.6.2 Cultivo de <i>Leishmania braziliensis</i>	53
7.6.3 Preparación de EAE	53
7.7 Infección de macrófagos con <i>Leishmania braziliensis</i>	53
7.7.1 Flujograma del proceso de infección y administración de EAE en macrófagos	54
7.8 Análisis estadístico.....	55
7.8.1 Grupo control	55
7.8.2 Grupo EAE Mi	55
7.8.3 Grupo EAE 24	55

8.- RESULTADOS	56
8.1 Cultivo celular de mononucleares	57
8.2 Infección de macrófagos con promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	58
8.3 Índice de infectividad (EAE Mi).....	60
8.4 Índice de Infectividad (EAE 24).....	63
8.5 Capacidad Infecciosa.....	66
8.6 Capacidad microbicida.....	68
8.7 Índices fagocíticos.....	70
9.- DISCUSIÓN	72
10.- CONCLUSIONES	76
11.- RECOMENDACIONES	77
12.- BIBLIOGRAFIA	78
13.- ANEXOS	65



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1

Tabla N° 4	Análisis del índice de infectividad de macrófagos que recibieron EAE al momento de la infección.....	86
Tabla N°5	Análisis del índice de infectividad de macrófagos que recibieron EAE 24 horas antes de la infección.....	87
Tabla N°6	Análisis de la capacidad infectiva a diferentes tiempos de administración de EAE.....	88
Tabla N°7	Análisis de la capacidad microbicida a diferentes tiempos de administración de EAE.....	89
Tabla N°8	Análisis de los índices de fagocitosis de los grupos de macrófagos en el tiempo.....	90
Tabla N°9	Componentes del medio M199 para amastigotesaxénicos.....	91
Tabla N°10	Rendimiento y actividad leishmanicida in vitro de alcaloides quinolínicos de Galipea longiflora.....	92
Tabla N°11	Distribución t Studen.....	93
Tabla N°12	Declaración de consentimiento Informado.....	94
Tabla N°13	Certificado de aval ético.....	95

1.- INTRODUCCION

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, inflamatoria crónica de la piel, mucosa o vísceras, producida por varias especies de *Leishmania* que corresponde a un parásito de tipo protozoo cinetoplastido, intracelular obligado, transmitido a través de la picadura de flebótomos infectados.

En la transmisión los macrófagos del hospedero, toman contacto con los protozoos que ingresaron, realizando el proceso de la fagocitosis, lo que permite que se forme el fagolisosoma, en cuyo interior, el pH ácido provoca su transformación en *amastigotes* redondeados que carecen de flagelo pero que contienen una única estructura alargada parecida a las mitocondrias llamada cinetoplasto. Los *amastigotes* de *Leishmania* son los únicos que sobreviven y se reproducen en los fagolisosomas de los Macrófagos, con un pH de 4.5, gracias a que cuentan con un sistema de protección conformado por una enzima ATPasa transportadora de protones, que permite mantener el pH intracelular del parásito a 6.5. **(1)**

El desarrollo de esta enfermedad viene determinada por la respuesta inmunitaria del hospedero. Los individuos con inmunidad específica frente al parásito son capaces de controlar la infección o producir granulomas con escasos parásitos, mientras que los individuos anérgicos muestran lesiones difusas formadas por macrófagos cargados de parásitos. **(2)**

La Organización Mundial de la Salud indica que la Leishmaniasis tiene una distribución mundial y está presente en 4 de los 5 continentes del planeta (África, Asia, América y Europa); extendiéndose por 88 países (21 en América); la población en riesgo es aproximadamente 350 millones de habitantes (adultos y niños)

Estas cifras son de difícil evaluación debido a que su distribución es focal en zonas alejadas y dispersas, extendiéndose con casos no diagnosticados y casos asintomáticos y por que los Sistemas de Salud generalmente no consideran la declaración obligatoria de la enfermedad. En Bolivia el área endémica de la Leishmaniasis se extiende por más del 70% del territorio, solamente en 3 departamentos de los 9 (Oruro, Potosí y Chuquisaca) no se han reportado casos autóctonos, presentando una tendencia a incrementarse por influencias diversas.

(3)

El tratamiento convencional se realiza con antimoniales pentavalentes que son las drogas anti Leishmaniasis de primera línea desde hace más de 60 años; se absorben bien por vía intramuscular y por vía Intravenosa, su eliminación es rápida por vía renal, una pequeña fracción permanece en el cuerpo por un lapso medio de tres días aproximadamente.

Es necesario realizar un buen control al paciente, tratando de detectar temprano una eventual hepatotoxicidad, nefrotoxicidad o cardiotoxicidad, por lo que se aconseja la realización de un perfil hepático y renal en laboratorio y un electrocardiograma antes del tratamiento y cada 10 días durante el mismo, evitando de esta manera accidentes mortales. **(4)**

Originalmente, los Tsimanes y otros grupos étnicos de la región tropical del país manejan la *Galipea longiflora* Krause (Rutácea) Evanta como antiparasitario y leishmanicida, por lo que recolectan la corteza fresca del tronco de la Evanta y la utilizan en un emplasto que se aplica sobre la lesión, además de la realización de infusiones administradas por vía oral que llegan a cicatrizar la lesión. **(5)**

Debido a su potente actividad leishmanicida, en 1985-91 fue estudiada por un grupo de investigadores Franco – Boliviano que demostró su actividad antiparasitaria, aislando e identificando 12 alcaloides quinolínicos, presentes en las hojas, corteza y raíz de esta especie. Extractos de todos los órganos de *Galipea longiflora* Krause – Evanta (hojas, corteza, raíz y frutos) han sido objeto de ensayos biológicos *in vitro* con diferentes especies de *Leishmania*, tanto con

las formas promastigotes (presentes en el mosquito), como las formas amastigotes (presentes en el hombre y animales). **(6)**

Los estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas UMSA, permitieron llegar a demostrar científicamente que la forma más efectiva del extracto de alcaloides totales de Evanta (EAE) como agente antiparasitario se encontraba en la corteza de esta planta **(7)** por las quinolinas allí presentes, de las que la 2- fenilquinolina, es la más efectiva. **(5)**.

El equipo de investigadores del laboratorio de inmunología del Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas UMSA, realizó estudios sobre los efectos de EAE a partir del año 2005, demostrando inicialmente que la concentración de 50ug/mL resultó tóxica para los cultivos celulares, con la sugerencia de disminuir dicha concentración para los siguientes estudios, posteriormente se verificó que el uso de una dosis de 10 ug/mL, mantuvo un efecto fuerte sobre el crecimiento del parásito, resaltando que a esta concentración EAE no afecta la viabilidad de las células eucariotas. **(8)**

Realizaron investigaciones sobre la producción de óxido nítrico, TNF, $IFN\gamma$ en cultivos celulares murinos que sugieren que EAE afecta la producción de citoquinas proinflamatorias, indicando un posible efecto antiinflamatorio **(8)**

Complementando con el estudio de la expresión del gen de $IFN\gamma$ y la producción de esta glucoproteína inducida por Conavalina (Con A) en esplenocitos murinos, probando el efecto modulador de EAE en la proliferación celular y producción de citoquinas, que llevó al empleo de células mononucleares humanas de sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis, presentando una disminución de esta, al ser pre- tratadas con EAE. **(9), (65), (66)**

Observación que fue ampliada por el estudio sobre el efecto de EAE en la capacidad infectiva y microbicida de macrófagos murinos infectados con promastigotes de *L.braziliensis*, en que EAE actúa sobre la capacidad infectiva de

los parásitos, ejerciendo un control de la infección en sus formas promastigote y amastigote, y que la capacidad microbicida se mantiene efectiva aún a las 72 horas post infección, atenuando los mecanismos de evasión del parásito en células infectadas y pre tratadas con EAE

Basados en esta experiencia se plantea la hipótesis, que la cura no solo se debe a la acción sobre el parásito, sino a una combinación de los efectos sobre algunos componentes de la respuesta inmune con los del extracto, sugiriendo que podría ser considerado como un tratamiento alternativo en Leishmaniasis. **(8)**

El presente estudio analizó el efecto de EAE sobre una población de pacientes que cursaban con la enfermedad de *Leishmaniasis* en una comunidad del norte del departamento de La Paz, Bolivia, de quienes se obtuvieron macrófagos humanos derivados de mononucleares de sangre periférica, para ser infectados con *Leishmania braziliensis*, a diferentes tiempos, evaluando así el efecto del extracto de EAE, sobre la capacidad infectiva de los parásitos, así como sobre la actividad fagocítica de estos leucocitos.

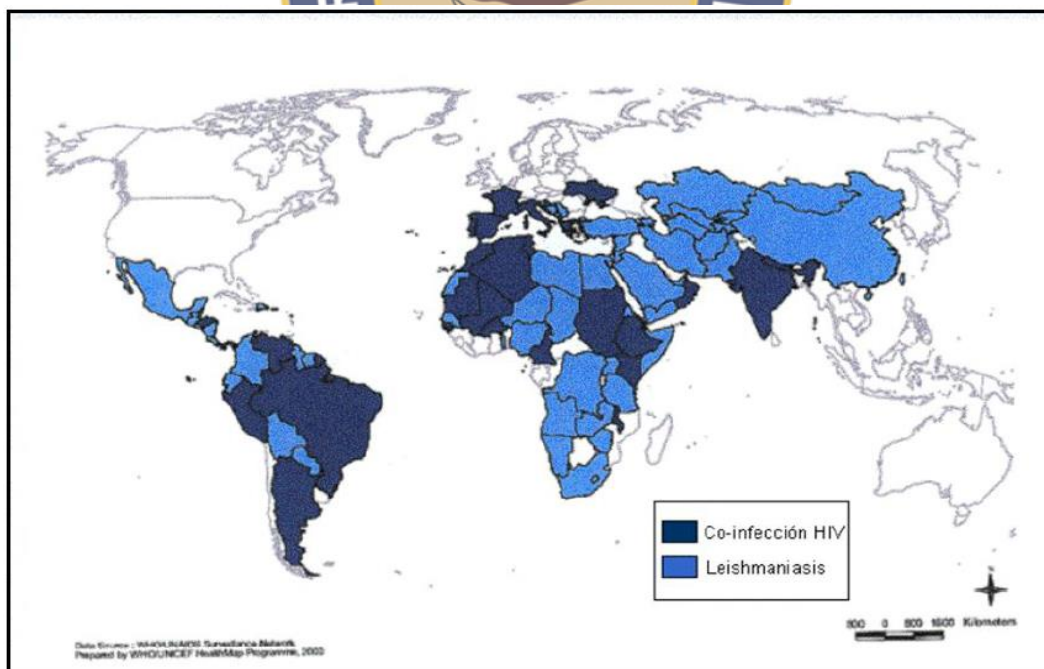


2.-MARCO TEÓRICO

2.1.- Leishmaniasis

Leishmaniasis es un complejo de enfermedades que demuestran una gran diversidad clínica y epidemiológica, cuyo agente etiológico es el parásito protozoo del género *Leishmania*. A nivel mundial, el subregistro de casos es elevado; sin embargo, estimaciones basadas en datos disponibles de la OMS indican que son susceptibles de contraer la enfermedad alrededor de 350 millones de personas y que en la actualidad existen unos 12 a 14 millones de infectados, con unos 500,000 casos nuevos de Leishmaniasis visceral y 2 millones de casos en 88 países de Leishmaniasis cutánea ulcerada por año. (10) (Graf.1)

Figura N° 1 Distribución de la Leishmaniasis en el mundo

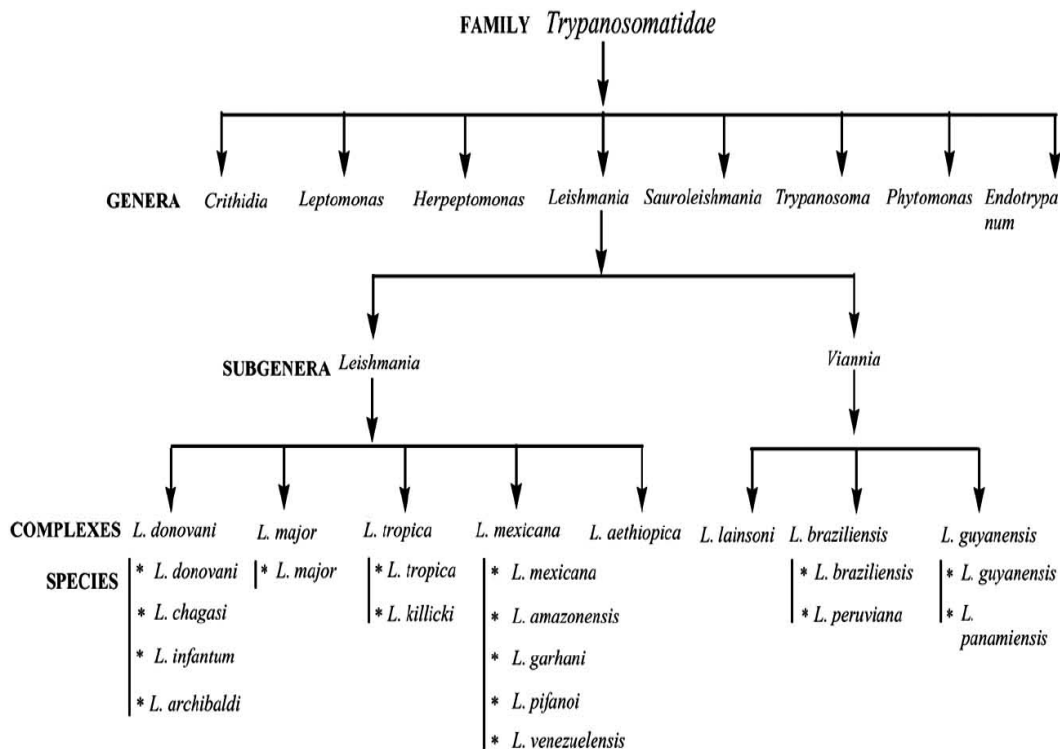


En azul claro están representadas las regiones con leishmaniasis, en azul oscuro las regiones donde se ha observado co-infección con el virus HIV. Mapa de distribución endémica mundial de Leishmaniasis elaborado por UNICEF, 2000. (11)

2.2.- Clasificación

El parásito de *Leishmania* es un protozoo que pertenece a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida y género *Leishmania* (Fig. N°2), que se agrupan en dos subgéneros de acuerdo con el sitio donde se desarrollan en el intestino del vector; las especies que se desarrollan en el intestino medio de los flebotomíneos, son las especies del Viejo Mundo y el complejo *mexicana* del Nuevo Mundo, mientras que en el subgénero *Viannia* se agrupan las especies que se desarrollan en el intestino posterior a la altura del triángulo pilórico, dentro del cual se incluye el resto de las especies del Nuevo Mundo, como *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis*.

Figura N°2 Clasificación taxonómica de *Leishmania*



Clasificación taxonómica de *Leishmania* Spp. (11)

2.3.- Vector.-

El vector, un artrópodo flebótomo del género *Lutzomyia* (en América), pica al hombre o a los animales para alimentarse de su sangre. Durante la etapa de gestación las hembras chupan los amastigotes del tejido del mamífero infectado u hospedero y estos presentan dos estadios en su ciclo de vida: el ***promastigote***, de forma flagelada, móvil, que tienden a ser más pequeños y delgados (insecto vector), y el ***amastigote***, que no presenta flagelo, es inmóvil, se lo encuentra dentro de los macrófagos del hospedero mamífero. (11)

En estos hospederos, el parásito debe ser capaz de adaptarse a vivir en tres microambientes diferentes: 1) en el tracto digestivo del insecto vector; 2) en el compartimento extracelular de los hospederos mamíferos, una vez que el promastigote es inoculado por el insecto vector, y 3) en los fagolisosomas de los macrófagos.

2.4.- Biología Molecular y Bioquímica de *Leishmania*

Leishmania, al igual que otras especies del orden Kinetoplástida presenta peculiaridades moleculares y bioquímicas que la diferencian del resto de organismos eucariotas. Entre las características moleculares se encuentran:

2.4.1.- Kinetoplasto

Es un orgánulo en el que se concentra toda la información genética (DNA) de su única mitocondria y que se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo. Estudios de microscopía electrónica han revelado una red altamente ordenada, que se reparte en agrupaciones circulares y concatenadas, denominadas maxicírculos (35kb – 50kb) y minicírculos (0.8kb – 1.6kb), y presentan un 10 – 15% del DNA total del parásito (37). En el mantenimiento de esta estructura participan cuatro histonas (KAP1-KAP4) (12). En el maxicírculo se codifican las subunidades de los

complejos respiratorios de la mitocondria y en los minicírculos se codifican los pequeños RNAs indispensables para la corrección del RNA (*RNA editing*). **(12)**

2.4.2.- Genoma

Leishmania major posee $33,6 \times 10^6$ pares de bases (33,6 Mb) por genoma haploide (*Leishmania* Genome Network, www.genedb.org), con un contenido en G+C del 60%. **(13)** Carece de condensación cromosómica en la mitosis lo que imposibilitó la visualización de los cromosomas del parásito hasta que se desarrolló la técnica de electroforesis de campo pulsado (CHEF), en la que la bandas resueltas en geles de agarosa representan cromosomas completos, pudiéndose realizar “cariotipos” moleculares.

Estos estudios pusieron de manifiesto la gran plasticidad cromosómica del parásito, ya que se suelen encontrar variaciones en el tamaño de los cromosomas. **(14)** Se estima que el número de cromosomas de *Leishmania* es de 36, con tamaños que oscilan entre 0,3 y 2,8 Mb. **(15)** El genoma de *L. major* está secuenciado en su totalidad; para el proyecto genoma de *Leishmania* se ha usado la cepa de *L. major* MHOM/IL/80/Friedlin. Actualmente se está secuenciando el genoma de *L. infantum* clon JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877).

Se calcula un número de genes en torno a 8.000, lo que equivaldría a un gen completo cada 3,5 Kb. Sin embargo, el número de proteínas es mucho mayor, lo que no puede deberse a procesos de *splicing* alternativos, puesto que *Leishmania* está desprovista de intrones **(16)**. Los primeros análisis indican que más de la mitad de estos genes serían únicos de *Leishmania*, y que una proporción bastante elevada no tienen función identificada.

Por la elevada plasticidad del genoma de *Leishmania*, abundan los procesos de amplificación génica que utilizan en caso de estrés como la exposición a fármacos, disminuyendo la expresión de enzimas como la aquagliceroporina 1, proteína responsable de la entrada de SbIII en el caso de los antimoniales, o

disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial para que la Pentamidina no se acumule tan rápidamente en ella, quedando libre en el citosol. Desde aquí, sería eliminada por medio de bombas activas, probablemente miembros de la familia ABC como PRP1, la disminución en la entrada de miltefosina se consigue tras la modificación en la expresión o inactivación de cualquiera de las dos proteínas que forman parte de la maquinaria de translocación de miltefosina. (17)

2.4.3.- Regulación de la expresión génica en *Leishmania*

Los genes no suelen tener promotores individuales, por lo que no son regulados en su mayoría por la iniciación de la transcripción. Cuando se necesitan niveles altos de ciertos transcritos, los genes aparecen con múltiples copias formando un tándem que se transcribe simultáneamente (18) fenómeno que permite a *Leishmania* resistir a un medio agresivo, explicándose así la menor acumulación neta del fármaco observada, la formación de complejos tiólicos con los fármacos y alteraciones en la fluidez de la membrana celular con cambios en su composición lipídica así como el cambio en función al transportador de miltefosina (LdMT) que disminuye la translocación de la miltefosina.(17)

2.5.- Metabolismo

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

A pesar de estas diferencias, ambas formas de vida, el promastigote, así como el amastigote, comparten una serie de características metabólicas muy diferentes a las del hospedador vertebrado, lo que permite seleccionar dianas de interés para el diseño racional de fármacos. **(19)**

2.5.1.-Tráfico de hemo

Otra diferencia importante entre *Leishmania* y su hospedador mamífero es la auxotrofia por el hemo. Debido a esta característica *Leishmania* debe tomar este importante metabolito desde su exterior celular.

Los tripanosomátidos como *Leishmania* necesitan tomar el grupo hemo desde el exterior para suplir sus necesidades metabólicas. **(20)** A diferencia de los eucariotas superiores se ha reportado que *Leishmania* posee cinco de las ocho enzimas necesarias para la biosíntesis de hemo con excepción de la ferroquelatasa. Este defecto en la síntesis de tetrapirroles se manifiesta por un requerimiento nutricional de hemo o hemoglobina (Hb) o su precursor intermediario, la protoporfirina IX. **(21)**

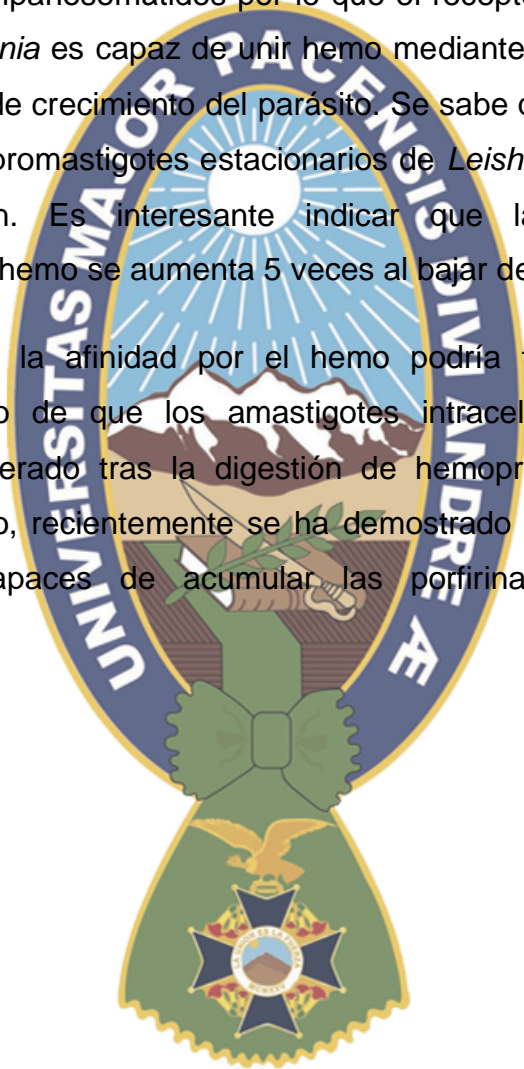
El hemo es requerido para la síntesis de diversas hemoproteínas como son los citocromos. Por lo tanto, *Leishmania* necesita tomar este metabolito cuando está presente en el insecto vector o dentro del macrófago. Se ha demostrado que *L. mexicana* posee en su membrana una molécula que une hemo específicamente y que esta unión se ve aumentada en la fase logarítmica de crecimiento y disminuye en la fase estacionaria de crecimiento.

No se sabe a ciencia cierta cual es la fuente fisiológica de hemo en los amastigotes intracelulares de *Leishmania*, la Hb **(22)** o bien el hemo liberado tras la digestión de Hb y de otras hemoproteínas del hospedador en la vacuola parasitófora.**(22),(25)** En cualquier caso, la obtención de Hb por parte de *Leishmania* es un proceso de endocitosis mediada por receptor en que la Hb se une a una hexoquinasa de 46 kDa que se encuentra ubicada en el bolsillo flagelar,

(22) posteriormente el hemo libre es capaz de entrar en el parásito por un mecanismo de formación de endosomas tempranos en un proceso mediado por Rab5, y en los endosomas tardíos por Rab7. **(23)**

En mamíferos, recientemente se ha descrito la existencia de un transportador (HCP1) implicado en la entrada de hemo en el intestino. Sin embargo, no existe ningún homólogo en tripanosomátidos por lo que el receptor de *Leishmania* debe ser diferente. *Leishmania* es capaz de unir hemo mediante un receptor específico modulado por la fase de crecimiento del parásito. Se sabe que existirían 400 sitios de unión a hemo por promastigotes estacionarios de *Leishmania*, y unos 1700 en parásitos en división. Es interesante indicar que la afinidad de estos transportadores por el hemo se aumenta 5 veces al bajar de pH 7,4 a 5,4. **(24)**

Este aumento de la afinidad por el hemo podría tener una importancia fisiológica en el caso de que los amastigotes intracelulares de *Leishmania* captasen el hemo liberado tras la digestión de hemoproteínas en la vacuola parasitófora. De hecho, recientemente se ha demostrado que estos amastigotes intracelulares son capaces de acumular las porfirinas sintetizadas en el macrófago. **(25)**



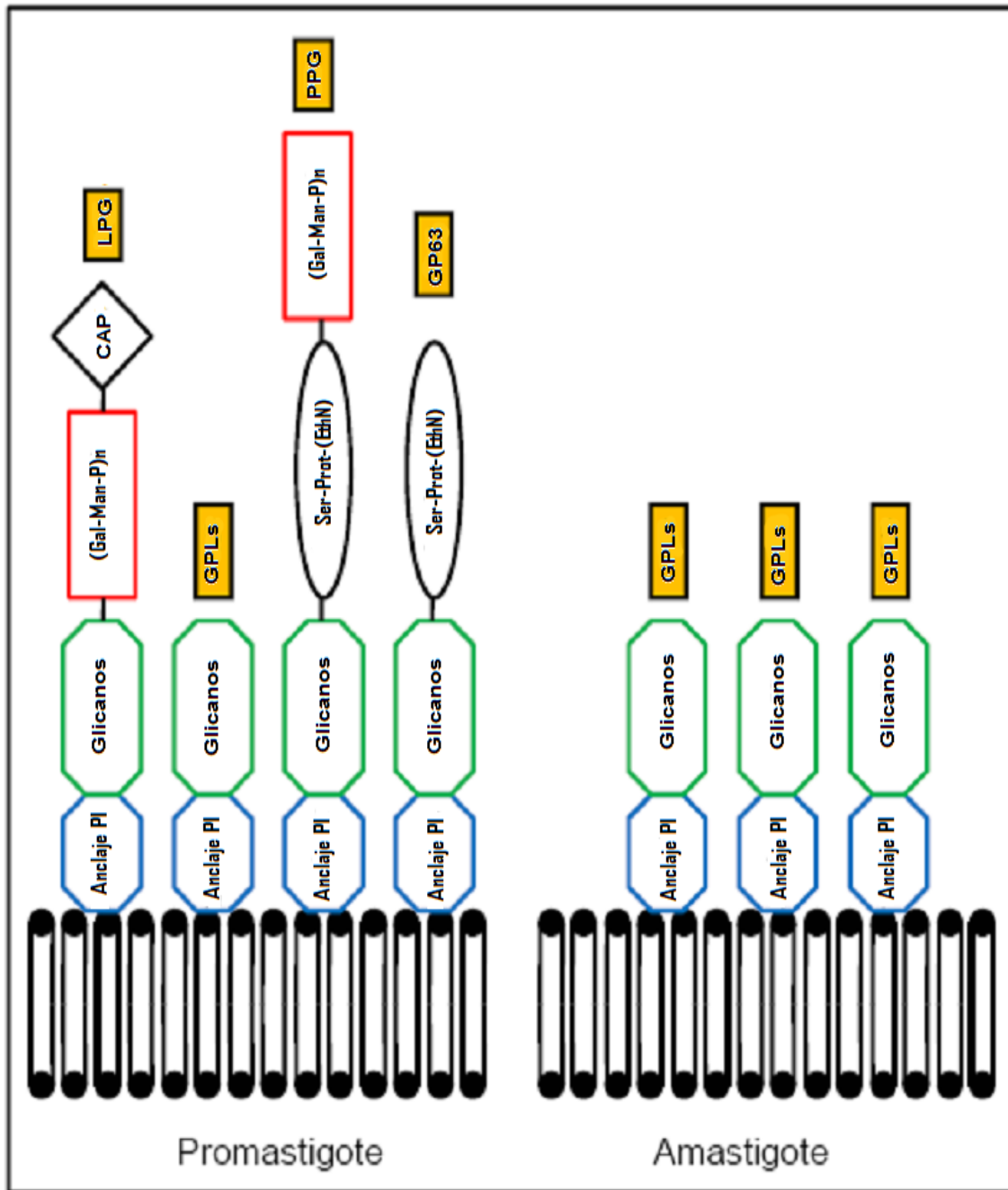
2.6.- Componentes de la membrana de *Leishmania*.

La membrana plasmática de *Leishmania*, así como la de cualquier tripanosomátido, presenta tres características específicas que la diferencian de la de los eucariotas superiores. La primera es que toda la membrana plasmática se ve recubierta en su cara citoplasmática por una red de microtúbulos.

La segunda característica específica de la membrana de los tripanosomátidos es debida probablemente a la anterior, ya que esa solidez impuesta por la red de microtúbulos restringe los procesos de endocitosis y excitosis, que sólo se llevarán a cabo en una zona determinada de la membrana plasmática del parásito desprovista de éstos y situada en el extremo apical del parásito en la base del flagelo, denominada bolsillo flagelar. **(25)**

Por último, *Leishmania* presenta una cubierta externa compuesta fundamentalmente por una gran cantidad de componentes con estructuras GPI (glicosilfosfatidilinositol) **(Fig 3)**, la cual tiene una función de protección del parásito en procesos como la lisis mediada por complemento o por hidrolasas; a la vez que aportan virulencia. Las macromoléculas que componen esta envoltura externa son mayoritariamente glicoproteínas, proteofosfoglicanos (PPG) altamente glicosilados y lipofosfoglicanos (LPG) complejos. **(26)**

Figura N° 3. Superficie celular de Leishmania



En la fase de promastigote, la cara externa de la membrana plasmática contiene varias clases de macromoléculas ancladas a GPI: lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas (tales como GP63) y proteofosfolicanos (PPG). Por debajo de estas macromoléculas se encuentra una densa capa de GPIs libres. En la fase de amastigote, los GPIs libres se mantienen mientras que la expresión de las macromoléculas ancladas a GPI disminuye notoriamente. (26)

Entre los componentes de la membrana del parásito anclados a GPI que contribuyen a la virulencia y patogénesis del parásito encontramos a la glicoproteína GP63 que es la principal proteasa de la superficie de *Leishmania* perteneciente al grupo de las metaloproteasas. Tiene un tamaño de 63 KDa, y también se ha denominado leishmanolisina o PSP (de *promastigote surface protease*). Se expresa en promastigotes y amastigotes; cada promastigote está cubierto por 500.000 copias, lo que corresponde a un 1% del total de las proteínas celulares.

Esta proteína, facilita la evasión del parásito de la lisis mediada por complemento, puesto que es capaz de inactivar mediante procesamiento enzimático a ciertos componentes de este sistema como son los factores C3 o C3b. Igualmente, se sabe que actúa como una “opsonina”, facilitando la fijación del parásito a receptores del macrófago. Además, su actividad enzimática protege al amastigote de la degradación en el fago lisosoma. **(27)**

Los LPG son las macromoléculas más abundantes de la superficie de los promastigotes, ya que hay alrededor de 6 millones de unidades por célula, y son además ubicuos en todas las especies de *Leishmania*. Al igual que los PPG presentan cadenas de fosfoglicanos, pero suelen ser mucho más largos, aunque tanto su longitud como su naturaleza varían en función del estado de desarrollo del parásito. **(28)** Los LPG protegen al parásito frente a la respuesta humoral del hospedador, participan en la unión al macrófago, bloquean el proceso de maduración del fagosoma y defienden al parásito de la respuesta inmune inhibiendo la respuesta oxidativa o la traducción de señales del macrófago. **(29)**

Durante la diferenciación de los promastigotes procíclicos a promastigotes metacíclicos (metacicloogénesis), la expresión de moléculas tales como LPGs o GP63 sufre modificaciones de importancia tanto a nivel cuantitativo como cualitativo. Los PPG son menos abundantes que GP63 y LPG, pero no por ello dejan de ser componentes importantes en el glicocálix de los promastigotes. Algunos de ellos también están anclados a la superficie por GPI, y están

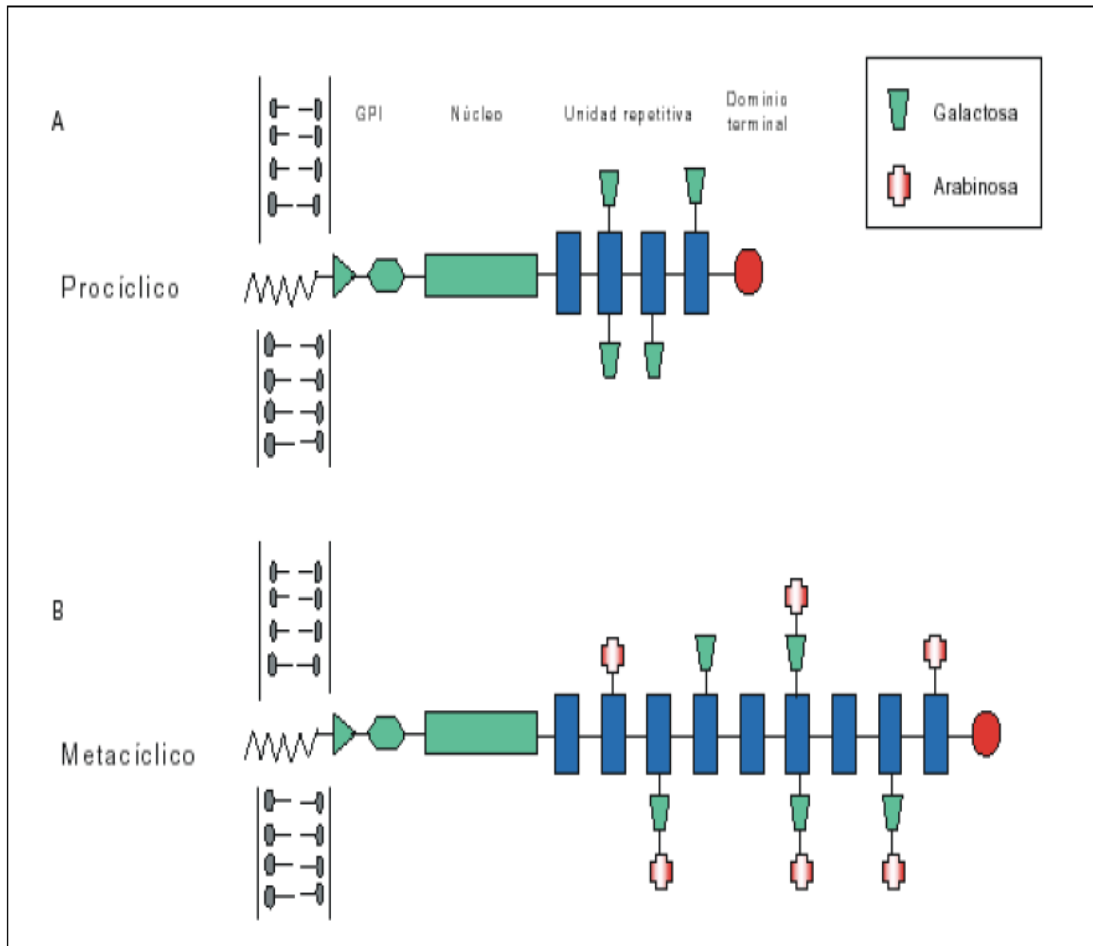
constituidos por un esqueleto polipeptídico modificado por cadenas complejas de fosfoglicano.

Existen evidencias acerca de la contribución de los PPG al establecimiento de la infección en el hospedador por parte del parásito, no sólo a través de los fosfoglicanos, sino también a través de unas estructuras con repeticiones de leucinas en el extremo N-terminal. **(30)** Los glicolípidos GPI libres son numéricamente más abundantes que todas las macromoléculas ancladas a GPI juntas y, a diferencia de las anteriores, la cantidad de GPI libres no disminuye cuando los promastigotes se diferencian a amastigotes. Por ello, son los componentes de membrana más abundantes en la superficie de los amastigotes. Además, los amastigotes adquieren glicoesfingolípidos pertenecientes a los macrófagos que han infectado, lo que puede considerarse como un mecanismo de evasión inmune.

2.6.1 Los Lipofosfoglicanos

Los LPG son glycosylfosfatidylinositol polimórfico anclados a polisacáridos que contienen un 1-0alkil1-2lyso-fosfatidylinositol en el cual la cadena alifática consiste en un C-24 o C26 saturado, siendo un hidrocarbano no ramificado, mientras que el GIPLs tienen el mismo 1-0alkilglicerol, algunos poseen ácido graso esterificado en C-2 del glicerol en la espina dorsal, que se expresan abundantemente en la superficie de los promastigotes, principalmente en cepas del subgénero *Leishmania*, pero que sufren una considerable disminución o están ausentes, según la especie, en el estadio amastigote. **(11)** En el subgénero *Leishmania*, el LPG se expresa sobre toda la superficie del promastigote, incluido el flagelo, y está organizado como un filamento densamente empaquetado que forma un glucocalix. **Fig 4.(A)**

Figura N°4.- Modificación del LPG en el proceso de maduración.



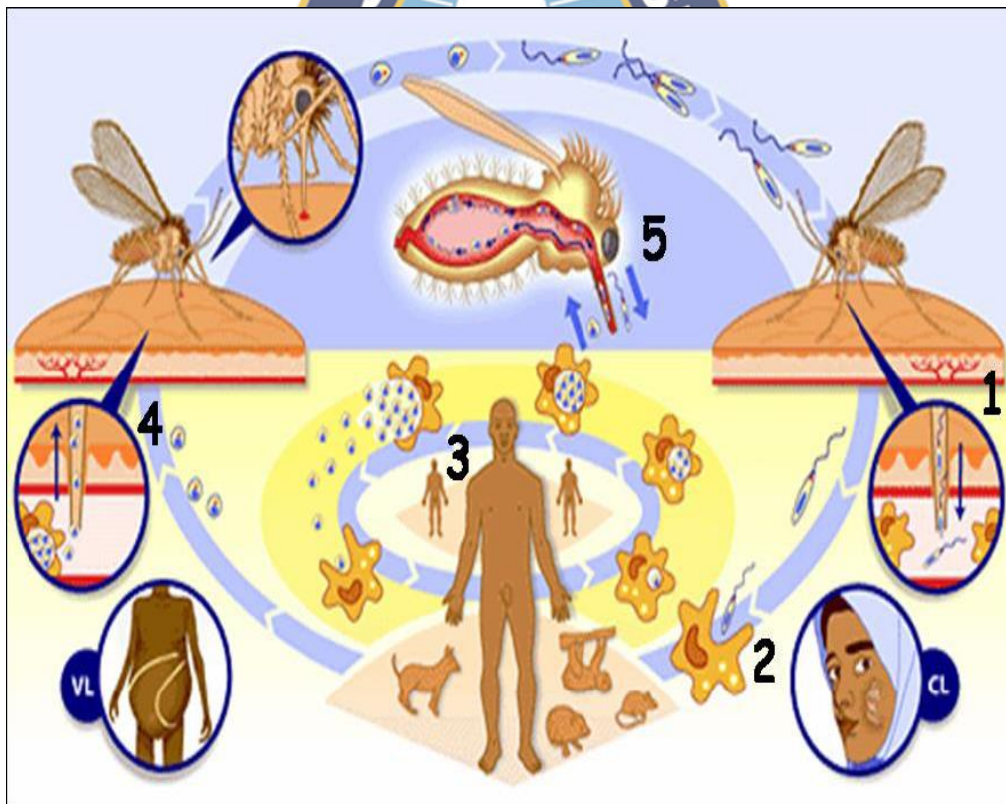
A) LPG promastigote en etapa de maduración Procíclico. B) LPG promastigote maduro Metacíclico. (31)

La modificación del LPG durante la maduración a promastigote en las especies hasta ahora caracterizadas consisten básicamente en dos tipos de cambios: 1) incremento en el tamaño del LPG y 2) sustituciones o modificaciones en la composición de azúcares que conforman algunas de estas unidades repetitivas o del dominio terminal. El aumento en el tamaño del LPG se debe a una duplicación en el número de unidades repetitivas a medida que los promastigotes se diferencian desde la fase de crecimiento logarítmica a estacionaria **Fig. 4(B)**.

2.7.- Ciclo de vida de *Leishmania*

Este protozoo presenta un ciclo de vida constituido por dos etapas: **A)** Realizada en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (*Phlebotomus* en el Nuevo Mundo y *Lutzomya* en el Viejo Mundo) bajo una forma flagelar denominada promastigote. (**Fig 5**)

Figura N° 5.- Ciclo de vida de *Leishmania*.



Mediante la picadura del flebótomo, los promastigotes metacíclicos son inoculados en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado (1), donde son fagocitados por los macrófagos (2). Tras la formación del fagosoma (fagolisosoma), los amastigotes se replican dentro del macrófago, lisando finalmente la célula para ser liberados e infectar nuevos macrófagos (3). El ciclo se cierra cuando en una nueva picadura, el insecto vector ingiere macrófagos conteniendo amastigotes (4). Las formas amastigotes intracelulares vuelven a diferenciarse en promastigotes procíclicos, se reproducen dentro del tracto intestinal del insecto y migran a la probóscide de éste (5), desde donde podrán ser inoculados nuevamente en el hospedador vertebrado tras una nueva picadura (1). VL: Leishmaniasis visceral; CL: Leishmaniasis cutánea (32).

Cuando el flebótomo parasitado ingiere sangre del hospedador mamífero, inocula con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide; muchos de estos parásitos son eliminados por el hospedador y otros alcanzan las células fagocíticas donde son englobados en una vacuola parasitófora (fagolisosoma) con la finalidad de eliminarlo. **B)** Dentro del macrófago, el parásito sufre un proceso de transformación biológica que conlleva a la pérdida del flagelo y otros cambios bioquímicos, y moleculares que dan origen a los amastigotes intracelulares que le permitirán sobrevivir dentro de las células del mamífero. **(31)**

Posteriormente, los macrófagos parasitados circulantes son ingeridos por otro flebótomo en cuyo intestino se liberan los amastigotes, en la zona posterior del tubo digestivo estas formas del parásito se transforman en promastigotes procíclicos provistos de un flagelo corto, a los que se denominan nectomonadas (24 a 48 horas). Estas formas promastigotas dentro del tracto digestivo del vector sufren una serie de modificaciones morfológicas que conllevan a las formas infectivas denominadas formas metacíclicas que serán inoculadas posteriormente permitiendo al parásito cerrar el ciclo biológico. **(35)**

2.7.1.- Establecimiento y mantenimiento de la infección

Se ha sugerido una teoría, de forma que las primeras células fagocíticas que llegan al sitio de infección son los granulocitos polimorfonucleares (PMN), seguidos de oleadas de macrófagos. **(36)** Los promastigotes de *Leishmania* serían internalizados por los PMN, sobreviviendo dentro de ellos sin poder multiplicarse ni diferenciarse como un “**caballo de Troya**” para entrar finalmente a su hospedero sin ser reconocido. Estos PMN infectados serían fagocitados por los macrófagos, donde *Leishmania* se diferenciaría y proliferaría. **(34)**

En años posteriores estos autores, estudiaron que los promastigotes en estadio infectivo de *Leishmania* son anexina-V positivos tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. Demostraron que en los promastigotes metacíclicos poseen una

relación anexina V similar a los promastigotes en fase estacionaria. De este cultivo en fase estacionaria separaron los promastigotes positivos para anexina de los promastigotes negativos para anexina V. Para ello, usaron experimentos TUNEL que mide la fragmentación del DNA nuclear como un parámetro de apoptosis.

Encontraron, que en una población metacíclica positiva para anexina-V un 65% de la población fueron TUNEL positiva. Y un 35% resultaron Anexina-V negativa y TUNEL negativa. Demostraron, que en la población anexina positiva aparecen una forma redondeada de promastigotes que corresponderían a “fantasma”. Este estadio “fantasma” corresponde a un estadio tardío de apoptosis que incluso ha perdido su DNA. En cambio, en la población anexina negativa había formas alargadas.

Además, demostraron una correlación proporcional entre células apoptóticas/anexina-V positivas y virulencia de *Leishmania*. Posteriormente, tomaron promastigotes metacíclicos (que previamente habían demostrado que eran más virulentos que los promastigotes en fase estacionaria), y luego separaron dos poblaciones una anexina positiva (46.8 %) de forma redondeada y otra población anexina negativa de forma alargada. Purificaron los promastigotes anexina negativa con una contaminación de promastigotes anexina positiva de un 14.2 %.

Los promastigotes metacíclicos con una alta relación de anexina-V produjeron un desarrollo más severo de la enfermedad. En cambio la población anexina negativa con parásitos viables que contenían solo un 14.2% de promastigotes apoptóticos, no produjeron lesiones graves. Ratones infectados con un 100% de promastigotes apoptóticos no desarrollaron síntomas de la enfermedad.

Todos estos resultados indican que se requiere una población de promastigotes apoptóticos junto con una población de promastigotes no apoptóticos para llevar a cabo el proceso de infección. Estos autores también demuestran que estos promastigotes apoptóticos inducen las señales TGF- β , pero

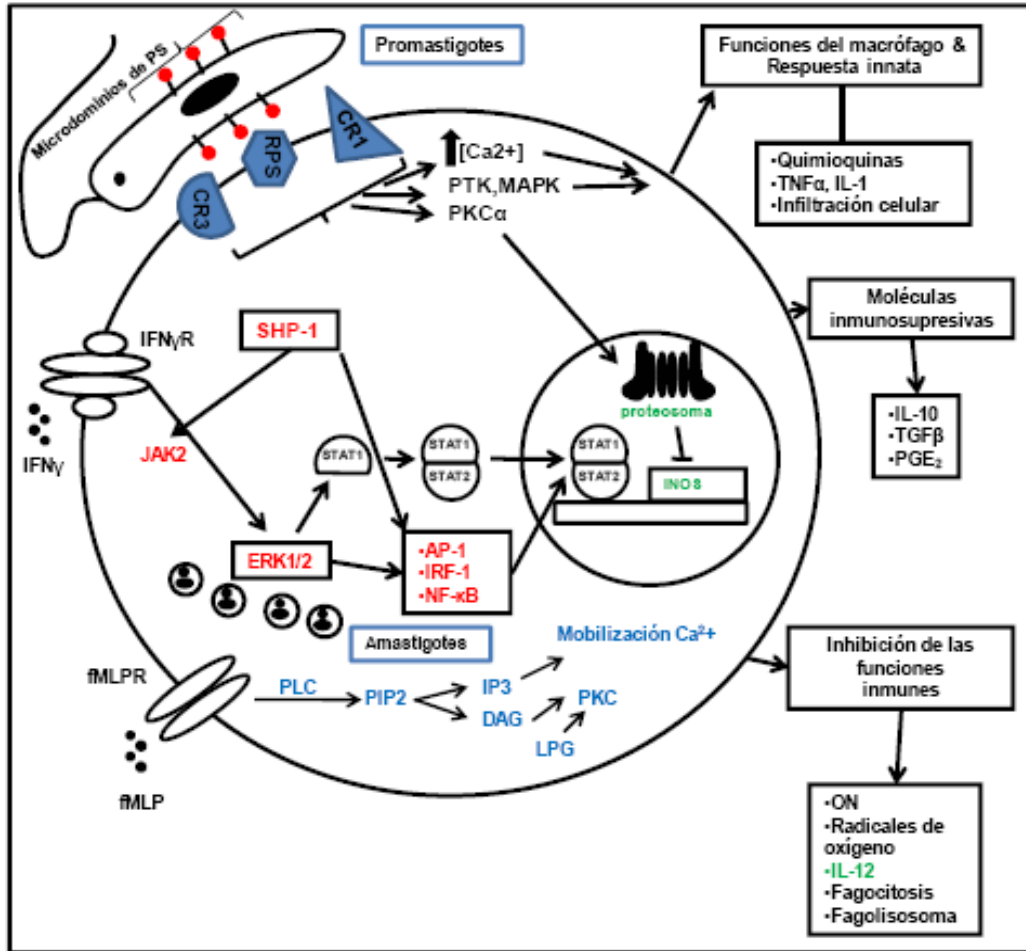
observaron una disminución de la señal TNF- α que conllevan al silenciamiento de los macrófagos. **(34)**

Una vez que *Leishmania* entra al macrófago usando como estrategia de infección la teoría expuesta en los párrafos anteriores. Se inician los procesos que conllevan al silenciamiento de los macrófagos. Una vez dentro del macrófago, los promastigotes metacíclicos son capaces de evitar la degradación, gracias a las moléculas de LPG y GP63 de su superficie. *Leishmania* se protege inhibiendo mecanismos de defensa de los macrófagos tales como la señalización celular y la producción de enzimas hidrolíticas, citoquinas y metabolitos tóxicos. **(18) (Fig 6)** En una etapa posterior se produce una activación alterada de ciertas funciones de los macrófagos, en particular la secreción de quimioquinas quimiotácticas. **(11)**

Los promastigotes tienen la capacidad de bloquear específicamente la expresión de IL-12 (citoquina inflamatoria) que es esencial a la hora de desarrollar resistencia adquirida a patógenos intracelulares. Así como, diversas proteinquinasa (PTK, MAPK), factores regulatorios de la señalización celular que se encargan de fosforilar y activar otros factores de regulación como ERK1/2. La inactivación de ERK1/2 a su vez inactiva los factores de transcripción NF κ B, IRF-1 y AP-1 que a su vez son los encargados de la activación en la producción de óxido nítrico y superóxido.

La desactivación de estas vías de señalización celular evita que el macrófago se active cuando recibe el estímulo del IFN γ o que conllevaría a un silenciamiento de las funciones del macrófago. Por ejemplo, no se forma el complejo activo STAT1/STAT2, y se estimula la formación del inmunoproteosoma. **(34)**

Figura N°6.- Eventos de señalización que conducen a la inhibición o inducción de las funciones del macrófago durante la infección en Leishmania.



La internalización de *Leishmania* dentro del macrófago es un evento mediado por receptor y esta interacción parásito-hospedero es responsable de la rápida activación y desactivación de las señales que regulan las distintas funciones del macrófago (fagocitosis, secreción de quimioquinas y secreción de prostaglandinas). SHP-1 afecta negativamente (JAK2, MAP quinasa como ERK1/ERK2, NF- κ B, IRF-1 y AP1, marcados en rojo en la figura) inhibiendo así las funciones del macrófago inducidas por IFN γ (óxido nítrico, producción de IL-12 y formación del inmunoproteosoma, en color verde). La degradación de STAT1/STAT2 por el proteosoma es dependiente de la quinasa PKC. Otras fosfatasa (IP3 y calcinerium) y moléculas de la superficie del parásito (LPG) alteran varios segundos mensajeros (PKC, Ca $^{2+}$, lípidos de inositol (DAG) e inositol fosfatos, color azul) que a su vez regulan funciones fagocíticas importantes del macrófago (producción de óxido nítrico y superóxido). DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipasa C; fMLPR: receptor formil péptido; PIP2: fosfatidil inositol 4,5.bifosfato (11).

Una vez que los promastigotes endocitados por el macrófago son incluidos en un fagosoma conocido como la vacuola parasitófora, la cual presenta características de compartimento endosomal/lisosomal, está repleta de enzimas hidrolíticas y mantiene un pH ácido. Las moléculas de LPG protegen al promastigote de estas condiciones extremas y GP63 tiene actividad proteasa que protege al parásito de la degradación lisosomal.

La vacuola parasitófora es una estructura dinámica que se forma a partir de la membrana plasmática la célula hospedadora, junto con otras tres estructuras citoplasmáticas como son los filamentos de actina, el sistema endosomal/lisosomal y el retículo endoplasmático. (35) Se sabe además, que la formación y maduración de la vacuola es un proceso dinámico que implica un intercambio continuo de moléculas entre el parásito y el hospedador. Se ha visto que macromoléculas pertenecientes al hospedador entran en el promastigote por fagocitosis a través del bolsillo flagelar. (33) Igualmente, se ha demostrado que la vacuola parasitófora adquiere material citosólico mediante dos rutas independientes: una actividad transportadora de aniones orgánicos y un mecanismo de adquisición de macromoléculas modulado por compuestos que afectan a la autofagia. (35)

2.8 Respuesta Inmunitaria

2.8.1 La respuesta frente a las infecciones puede ser innata o adaptativa

Las respuestas inespecíficas, externas e internas son **innatas**, desempeñan una importante función en la fase inicial de las infecciones, actuando inmediatamente el momento en que los agentes patógenos se ponen en contacto con el organismo, sin variar su forma de proceder e intensidad y no confiere protección frente a una reinfección

La respuesta inmune específica que es **adaptativa**, puesto que se desarrolla durante el tiempo de vida de un individuo como adaptación a las infecciones por

patógenos, además de eliminar al agente infeccioso, confiere protección a l hospedero contra la reinfección por el mismo agente, que constituye una protección efectiva contra los microorganismos patógenos, cuando estos han evadido los mecanismos innatos de defensa. **(36)**

2.8.2 Las defensas internas inespecíficas implican procesos químicos, celulares y coordinados

Los microorganismos que consiguen atravesar barreras externas encuentran otra serie de defensas inespecíficas que implican **procesos químicos** (secreción de diversas proteínas), **celulares** (fagocitosis) y **coordinados** (que implican al sistema nervioso).

Estos procesos incluyen:

- Sistema del complemento
- Los interferones
- La fagocitosis y otras defensas celulares
- La respuesta inflamatoria
- La tos y el estornudo
- La fiebre

2.8.3 Los fagocitos constituyen una importante defensa inespecífica contra los patógenos.

Los patógenos consistentes en **grandes moléculas**, células o virus se fijan a la membrana del fagocito, favorecida por la presencia de unas moléculas denominadas opsoninas (principalmente anticuerpos y algunos componentes del complemento) y éste los engulle por endocitosis, para que en su interior sean degradados por enzimas de los lisosomas. **(36)**

Los fagocitos pueden viajar por el sistema circulatorio o salir de él (diapédesis) y moverse entre las células de ciertos tejidos.

2.8.3.1 Fagocitos

Los fagocitos de la sangre periférica comprenden los monocitos (fagocitos mononucleares), neutrófilos y eosinófilos (fagocitos polinucleares). Todos ellos proceden de la médula ósea, y durante su permanencia en la misma, al tiempo que se produce su maduración morfológica, van adquiriendo las propiedades necesarias para llevar a cabo la función fagocítica

La movilización desde la médula ósea al torrente sanguíneo, a través de la adherencia al endotelio vascular, es requisito previo para la llegada del fagocito al foco hístico infeccioso. (37) Se denominan sustancias quimiotácticas aquellas que poseen la propiedad de atracción del fagocito hacia el lugar donde se encuentra la bacteria.

Tabla N° 1

De origen bacteriano (endotoxinas)
Fracción C3 y C5 activadas
Activador del factor de Hageman
Activador plasminógeno
Fibrinógeno y derivados de la fibrina
Calicreína
<i>Transfer</i> factor
Compuestos de los neutrófilos (fracciones lisosómicas, proteínas catiónicas)
Compuestos de los Macrófagos
Leucoegresina
Linfocinas
Lípidos oxidados-
AMPc

Principales sustancias quimiotácticas (38)

En la respuesta celular quimiotáctica estarían comprometidos los receptores de superficie, elementos contráctiles y energía metabólica, obtenida fundamentalmente a través del ATP generado en el proceso de digestión anaerobia, generando la respuesta quimiotáctica, en que intervienen los receptores de membrana y los factores quimiotácticos.

En la periferia de la célula fagocítica existe una zona citoplasmática de apariencia hialina (ectoplasma), parecida a un velo ondulante, y es particularmente prominente en dirección del movimiento celular. Dicho citoplasma hialino origina unas prolongaciones o *lamellipodia* que rodea a la partícula diana; **(tabla N°1)** su sub estructura está constituida por diversos tipos de microfilamentos, algunos de los cuales son polímeros de actina. Entremezclados con esta red filamentosa se observan microtúbulos que desde el centrosoma se dirigen a la periferia celular, y que actuando a modo de riendas son los responsables de la dirección del movimiento de la célula. **(38)**

Tras la quimiotaxis y el reconocimiento del objeto diana, se produce el fenómeno de la opsonización, por la cual las bacterias se combinan con componentes séricos que las vuelven más sensibles a su ingesta por los fagocitos. Los principales factores opsónicos son la fracción C3 activada (sistema opsónico termolábil) y las inmunoglobulinas (sistema opsónico termoestable).

Cuando los *lamellipodia* engloban completamente a la partícula que van a digerir, se constituye la vacuola fagocítica o fagosoma, y a partir de ese momento empieza la fagocitosis propiamente dicha, con una serie de cambios metabólicos en el fagocito.

Tabla N°2

<i>Granulación primaria</i>	<i>Granulación secundaria</i>
Mieloperoxidasa	Lactoferrina
Catepsina G	Proteínas copulativas de vitamina B12
Elastasa	proteasa activada por el complemento
Lisozima	Lisozima
Mucopolisacáridos sulfatados	
Enzimas hidrolíticas	

Principales componentes de la degranulación primaria y secundaria (38)

Una vez constituido el fagosoma tiene lugar el vertido de los gránulos citoplasmáticos en su interior y el fagosoma se convierte en una vacuola digestiva o fagolisosoma, primeramente vertiendo su contenido en la vacuola digestiva los gránulos secundarios, para finalmente hacerlo los primarios; **(Tabla N° 2)** a partir de ese momento y gracias a su gran riqueza en hidrolasas ácidas, desciende bruscamente el pH de la vacuola, con el consiguiente efecto microbicida.

La unión de la bacteria opsonizada con el receptor de superficie del fagocito condiciona una serie de importantísimos cambios metabólicos, conocido bajo la denominación de “estallido” o eclosión de la respiración celular, cuya finalidad básica es generar agentes microbicidas para la digestión, aumenta notablemente la captación exterior de oxígeno, que en su mayoría se convierte en agua oxigenada a través del anión superóxido que actúa como intermediario. Este por acción de una superóxido-dismutasa, da lugar al agua oxigenada, pero también puede dar lugar a otros agentes oxigenados importantes como el radical hidroxilo.

(38)

Los granulocitos segmentados circulan por la sangre periférica donde ejercen sus funciones de fagocitosis y bacteriolisis, según la granulación específica que posean, serán segmentados neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

2.8.3.1.1 Granulocitos

Los granulocitos neutrófilos son los fagocitos más abundantes (50-70% de los leucocitos), son células redondeadas, cuyo tamaño oscila entre 12 y 14 μm , su núcleo se encuentra segmentado en 2-5 lóbulos unidos por finos puentes cromatínicos. El citoplasma contiene numerosos gránulos neutrófilos, su actividad principal es reconocer y atacar a los patógenos de los tejidos infectados. **(39)**

2.8.3.1.2 Monocitos

Son las células más grandes de la sangre periférica, su tamaño oscila entre 25 y 30 μm de diámetro, con forma irregular cuadrangular u oval. El núcleo está situado en posición central en voluminoso y adopta formas muy abigarradas en herradura, indentado o doblado; la cromatina es densa y parece que estuviera peinada en finas franjas cromatínicas, característico de estas células, los monocitos están desprovistos de nucléolos, el citoplasma es amplio, presentando granulaciones secundarias, peroxidasa negativa, ricas en esterasas inespecíficas, fosfatasa ácida, B glucoronidasa, catepsina y aril sulfatasa, la actividad peroxidasa se ubica en la granulación primaria de los monocitos, típica de monocitos maduros. **(38)**

2.8.3.1.3 Histiocitos y macrófagos

Constituyen el último estadio evolutivo de las células del sistema mononuclear fagocítico, originados a partir de los monocitos sanguíneos, los histiocitos adoptan un aspecto morfológico característico y diferencial dependiendo del tejido u órgano donde finalmente se ubiquen. Los histiocitos del tejido conjuntivo se caracterizan por poseer un núcleo pequeño en relación con la gran extensión del citoplasma, que adopta una forma variable (redonda, oval, incurvada, bilobulada) y se sitúa generalmente en un extremo de la célula. La cromatina típicamente reticulada puede contener 1 o 2 nucléolos de tonalidad

basófila, el citoplasma incoloro o débilmente basófilo, se caracteriza por su gran extensión y por sus límites imprecisos.

Los monocitos madurados como macrófagos, son mucho menos abundantes, tienen capacidades como rastreo, así como la de residir permanentemente en los ganglios linfáticos, el bazo u otros órganos linfoides, inspeccionando la linfa en busca de patógenos. **(40)**

Sus funciones pueden resumirse en capacidad de migración, fagocitosis, actividad microbicida, iniciación y modulación de la respuesta inmune, síntesis de factores solubles como interferón y prostaglandinas, que llegan a intervenir en mecanismos defensivos.

Cuando un antígeno invade al organismo, los macrófagos lo fagocitan y digieren en su interior, donde algunos fragmentos del antígeno se unen a un complejo de proteínas sintetizadas por el macrófago, denominado **complejo mayor de histocompatibilidad II** (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) que los expone en la superficie celular para presentar los antígenos a los linfocitos T, denominado **inmunidad mediada por células**.

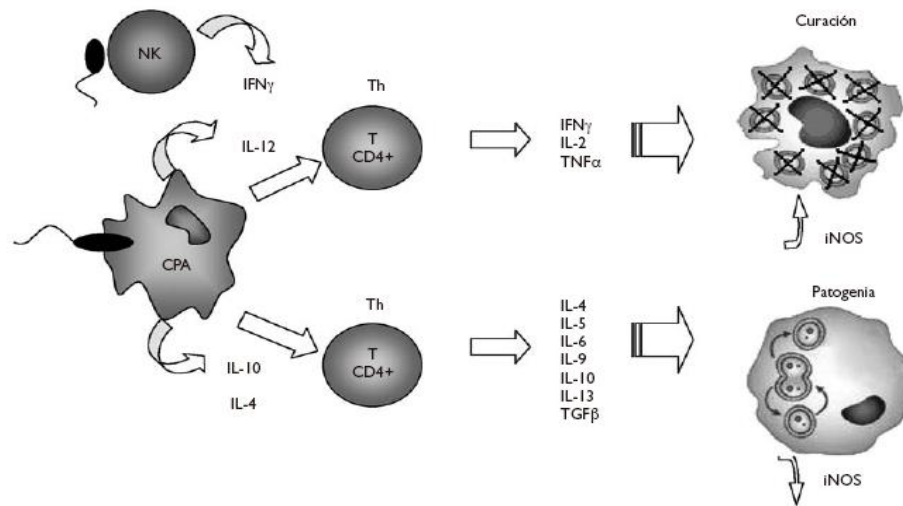
2.8.4 Reacción inmune en Leishmaniasis

En la Leishmaniasis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de la célula hospedera y se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos que promueven el incremento de la capacidad de estas células para producir oxígeno tóxico y radicales de nitrógeno en respuesta al interferón gamma ($IFN\gamma$), así como el factor de necrosis tumoral alpha ($TNF-\alpha$), el cual potencia la acción del $IFN\gamma$, promueven a la activación del macrófago, fenómeno que está relacionado con la curación. Adicionalmente el $IFN\gamma$ puede ser producida muy tempranamente por las células Natural Killer (NK); en tanto que las citocinas que desactivan al macrófago IL-4, IL-10, $TGF-\beta$, se

relacionan con la inhibición del $IFN\gamma$ resaltando que el $TGF-\alpha$ pueden ser transportado por las plaquetas, que son el primer elemento en arribar al sitio inflamatorio se correlacionan con la afección. (41,42)

Por esa razón se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenia (Fig. 7) señalando que el padecimiento se presenta en realidad por una sobreactivación de la respuesta inmunitaria al presentar bajos niveles de IL-10 y que la curación depende más de la relación entre las citocinas producidas y menos de la mera presencia o ausencia de citocinas en particular. (2)

Figura N° 7. Reacción inmunitaria a Leishmania



El modelo murino de la infección señala que la susceptibilidad y resistencia al patógeno dependen del patrón de citocinas expresado por los linfocito T. (43)

En este sentido, la participación de las células de la reacción inmunitaria innata, como células dendríticas (DC), NK y macrófagos, es motivo de ardua investigación. Se sabe también que la producción de $IFN\gamma$, IL-12, IL-10 y $TGF-\gamma$

por células en respuesta a *Leishmania* puede modificar en grado notable la respuesta inmunitaria. (43)

2.8.4.1 Fagocitosis mediada por receptor

La vía a través de la cual *Leishmania* entra en el macrófago se denominó fagocitosis mediada por receptor, y se ha demostrado que tanto glicoproteínas asociadas a membrana como lípidos de la superficie del parásito están implicados en la adhesión de éste a la membrana plasmática del macrófago (43). En el reconocimiento e internalización del parásito también participan otros factores como: los receptores del macrófago, los de fibronectina, de la manosa-fucosa o receptores de complemento CR1 y CR3 (44).

La proteína sérica C3 del complemento se deposita en la superficie del protozoo, reconociéndose así ciertos receptores de membrana del macrófago. Otras moléculas abundantes en la superficie de la *Leishmania* como LPG o Gp63, también se unen a estos receptores. Una vez fijados los promastigotes al macrófago, son englobados en una vacuola parasitófora, que se unen a lisosomas que contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir la *Leishmania*; sin embargo ésta se diferencia y se transforma en amastigote que resiste esta agresión y se multiplica dentro de estas vacuolas hasta que los macrófagos infectados ya no puedan contener más *Leishmanias* y la célula muere, liberando amastigotes que van a infectar otras células.

2.8.4.2 Papel de la fosfatidilserina en la infectividad de *Leishmania sp.*

Se ha demostrado que los promastigotes metacíclicos cultivados *in vitro* y que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento exponen más fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana y que la infectividad de estos parásitos está determinada por este hecho. (45)

La fosfatidilserina es un fosfolípido normalmente localizado en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesta en exceso hacia la cara externa sólo cuando las células entran en apoptosis. **(46)** El reconocimiento de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana conduciría a su internalización por los macrófagos. Moreira y col., 2001**(47)** demostraron que la interacción amastigote /macrófago dependía de la exposición en la cara externa de PS. Para ello, enmascararon los motivos de PS con anexina-V y observaron que el índice de infectividad en los amastigotes de *L. amazonensis* incubados con anexina V fue menor que el control. Luego quisieron ver si el reconocimiento por parte de los macrófagos peritoneales era mediante un receptor que reconoce ligandos de células apoptóticas. Para ello, utilizaron un anticuerpo monoclonal que reconoce un receptor redundante en la eliminación de células apoptóticas denominado receptor de fosfatidilserina (PSR) expresado en células de mamíferos como macrófagos. **(47,48)** Los resultados mostraron una disminución significativa del índice de infectividad entre amastigotes pre incubados con anexina V y este anticuerpo. Estos resultados indicaron que este receptor en los macrófagos puede reconocer PS sobre los amastigotes y sobre las células apoptóticas de mamíferos. Este autor plantea que el proceso de apoptosis puede ser usado en *Leishmania* como una estrategia para engañar al macrófago y así facilitar su entrada a la célula creando una condición de “mimetización apoptótica” y utilizarían el receptor PSR para entrar en la célula hospedera **(47)**.

El reconocimiento de PS conlleva a la secreción de TGF- β 1 y la producción de los RNAm de interleuquina 10 (IL-10) e inhibe la producción de óxido nítrico con la consecuente inhibición de la activación de los macrófagos **(11)**. Por otra parte, Tripathi y col., 2003 **(46)** demostraron que cultivos en fase estacionaria de crecimiento exponen más PS que el control y que el índice de infectividad se ve afectado en promastigotes estacionarios que han sido pre tratados con anexina-V y que este efecto no se observó sobre los promastigotes en fase logarítmica pre incubados con anexina-V. Además, mostraron que una actividad “out-to in” dependiente de energía es la encargada de redistribuir los C6-NBD en

promastigotes. Y que por ejemplo esta actividad fue reducida por la presencia de fosfolípido de cabeza larga.

Estos resultados indicarían que este transportador es más afín por los lípidos de cabeza larga. Por otro lado mostraron que la actividad de redistribución “in to out” de estos análogos no es dependiente de energía y no fue inhibible por vanadato. Al final los autores sugieren que ocurre una disminución en la actividad “out to in” dependiente de energía, es la responsable de la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana de los promastigotes en fase estacionaria. **(44)** Los promastigotes de *Leishmania* que llegan a ser destruidos por los macrófagos, liberan antígenos que son expresados en la membrana del macrófago y presentados a los linfocitos T en el contexto de los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, pero se debe tener en cuenta que la presencia de la infección por *Leishmania* dentro del macrófago interfiere con la presentación del antígeno y puede influenciar en el curso de la enfermedad.

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado, y según sean el tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, las células T CD4+ y CD8+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes **(49,50)** Las citocinas de tipo Th1, como IFN γ y TNF- α , participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con los isotipos IgG1 e IgG3 en seres humanos (IgG2a en ratones), mientras que las citocinas de tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata. **(50)**

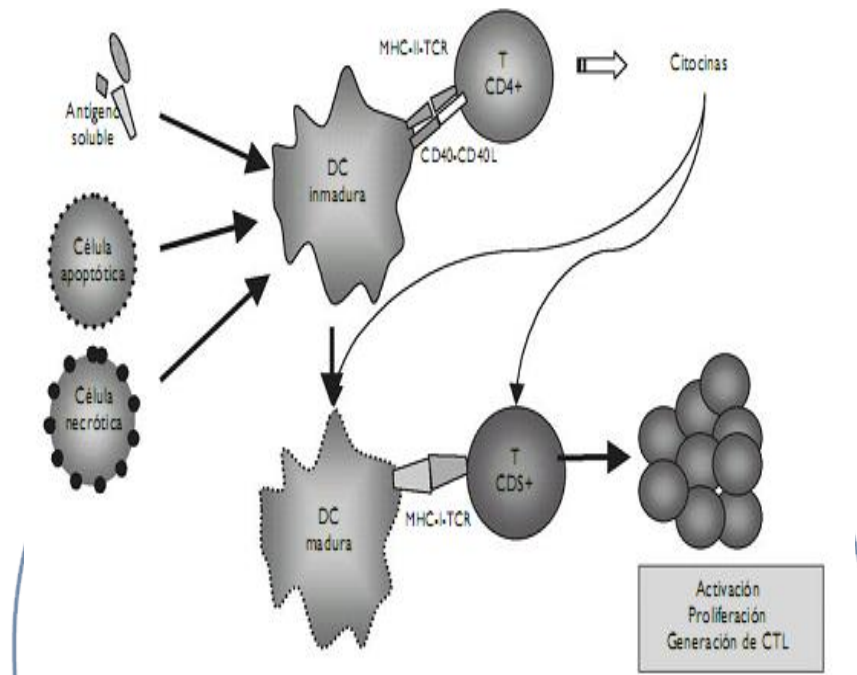
2.8.4.3 Participación de las células TCD4+en la Leishmaniasis.

El papel de las sub poblaciones de células TCD4+, Th1 y Th2, ha sido bien estudiado en la infección por *Leishmania major* en el modelo murino experimental. Las cepas singénicas de ratones que desarrollan el fenotipo Th1 (células que secretan principalmente IL-2, IFN γ y TNF-B) son resistentes a la infección por este protozoo. En contraste, las que desarrollan el fenotipo Th2 (células que secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) son susceptibles a ella **(53)**. Los estudios recientes indican que la IL-4 es una señal esencial en la estimulación primaria y maduración de las células Th2, mientras que IL-12 permite la maduración de las células Th1 **(43)**.

Adicionalmente, IL 4 e IFN γ ejercen efectos reguladores opuestos sobre las células Th1 y Th2 respectivamente. Por otra parte, varios estudios han establecido claramente que la subpoblación de linfocitos TCD8+ también contribuye a la resolución de la enfermedad y la resistencia contra la reinfección en Leishmaniasis cutánea. **(51)** En los humanos, aunque la respuesta inmune dirigida contra el parásito es menos polarizada que en el ratón, se ha evidenciado una clara tendencia hacia la producción del fenotipo Th1 en las formas menos severas de la enfermedad. La identificación de subpoblaciones de células T humanas que se correlacionen con susceptibilidad o resistencia a la infección podría ayudar al desarrollo de ensayos *in vitro*.

El modelo planteado hasta el momento sobre la participación de células dendríticas DC en la activación de células T CD8 señala que las DC capturan el antígeno por varias vías y pueden fagocitarlo directamente si se encuentra libre en el medio extracelular o bien adquirirlo de células apoptóticas o necróticas. Con posterioridad lo procesan y presentan a través de MHC II a las células T CD4+, las cuales sobre regulan la expresión de CD40L y, mediante la interacción con CD40, activan o inducen a las DC para estimular la respuesta de células T CD8+ vírgenes que reconocen el antígeno MHC I en las DC (Fig. 8).

Figura N°8. Interacción DC-CD4-CD8, activación de los linfocitos TCD8+



Para la activación de los linfocitos T CD8+, se requiere el concierto coordinado de estos tres tipos celulares. (43)

Es posible que algunas células apoptóticas posean CD40L y de esta manera puedan activar de forma directa a las DC sin la presencia de células CD4+. De esta forma, las DC tendrían la capacidad de activar las células T CD8+ específicas para los antígenos presentados. Estas células apoptóticas pueden provenir de células T CD40L+ recién activadas que sufren apoptosis una vez que han ejercido su función efectora en un tejido inflamado. **(52)**

2.8.4.4 Participación de las células CD8+ en la Leishmaniasis.

Algunas evidencias sugieren un papel importante de las células T CD8+ en la respuesta inmunitaria a los parásitos, por acción directa de mecanismos

citotóxicos o a través de la producción de IFN γ y TNF- α , que son citocinas activadoras de macrófagos y favorecen por tanto la muerte de parásitos intracelulares. **(53)**

En los seres humanos se piensa que los linfocitos T CD8+ juegan un papel crucial en la infección. Se ha notificado un elevado número de células T CD8+ en lesiones y sangre periférica durante la fase aguda de la infección y el proceso de eliminación de *L. major* y *L. mexicana*. **(54)** Los pacientes infectados con *L. braziliensis* presentan una mayor proporción de células T CD4+, en comparación con las CD8+, durante la infección activa y en el proceso curativo esta relación cambia hasta casi llegar al equilibrio al incrementarse el número de linfocitos T CD8+.

En otro estudio se reconoció que las lesiones de individuos con *Leishmania* cutánea localizada (LCL) también infectados con *L. braziliensis* exhiben un gran porcentaje de linfocitos T en apoptosis, y con mayor frecuencia en linfocitos T CD8+ que en linfocitos T CD4+. Por el contrario, las lesiones de personas con curación espontánea mostraron muy bajo porcentaje de células T CD8+ en apoptosis. **(54,55)**

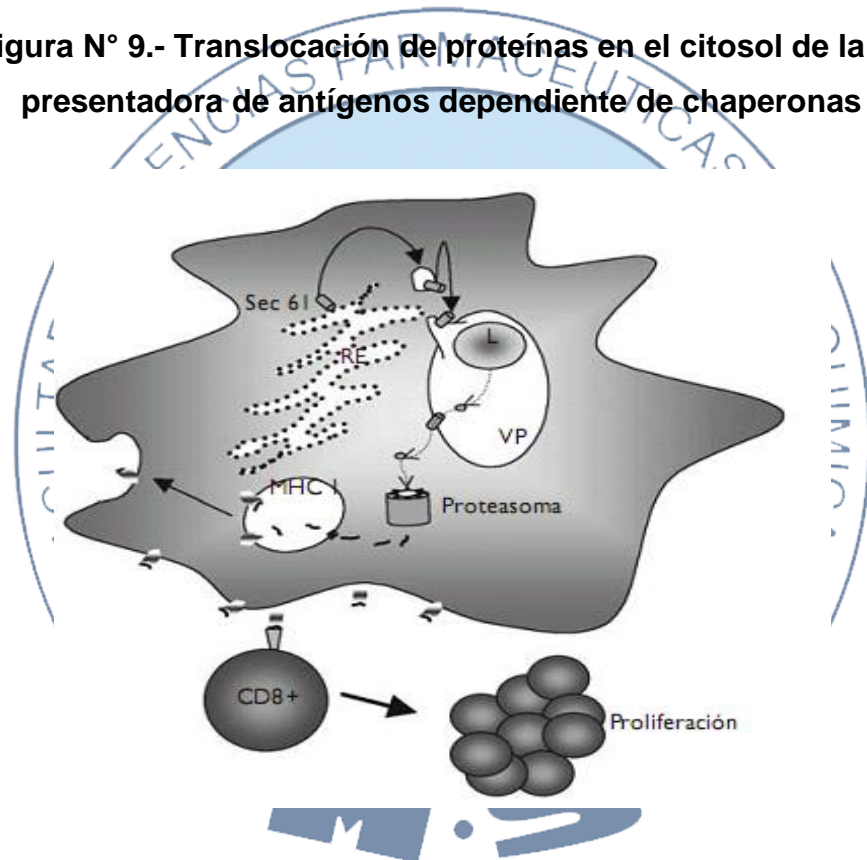
2.8.4.4.1 Vías de activación de las células T CD8+ en la Leishmaniasis

Uno de los puntos de discusión sobre la participación de las células CD8+ en la Leishmaniasis se sitúa en la forma de activación de este subtipo celular. Dado que es necesaria la presentación de antígenos por la vía de MHC I para la activación de linfocitos T CD8+, se ha pensado que esta vía interviene en la infección por *Leishmania*.

El macrófago es la célula hospedera por excelencia y es allí donde la *Leishmania* se desarrolla y prolifera. Sin embargo, existe la duda sobre la vía de presentación de antígenos del parásito. **(43)**

Leishmania se alberga dentro de la célula hospedera en un compartimiento fagolisosómico denominado vacuola parasitófora (VP). Aunque se desconoce si el contenido de la luz de la VP puede salir al citosol para degradarse y transportarse al retículo endoplásmico, y acoplarse a moléculas de MHC I, se describe una vía en la que DC y macrófagos presentan una translocación de proteínas desde la luz del fagosoma al citosol, que depende de la proteína chaperona Sec61 (**Fig. 9**).

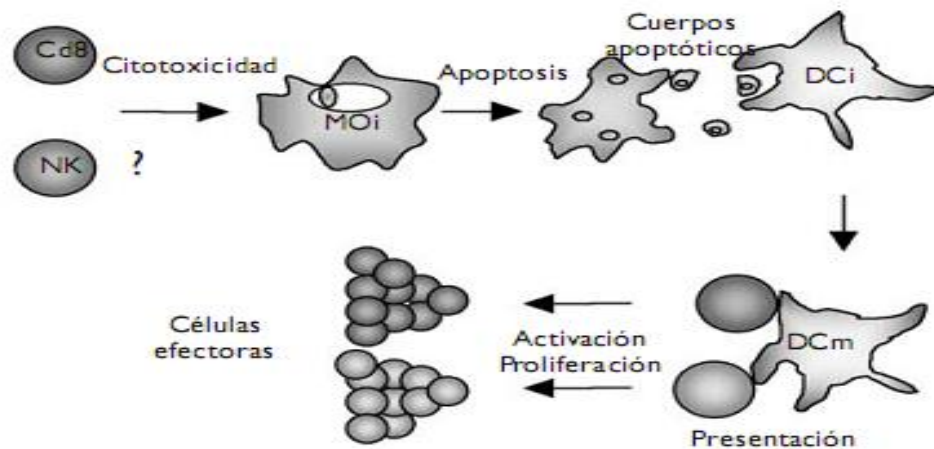
Figura N° 9.- Translocación de proteínas en el citosol de la célula presentadora de antígenos dependiente de chaperonas



Procesamiento de antígenos de Leishmania mediante MHC I (Mecanismo directo). Transpresentación de antígenos exógenos a través de Sec6 I. (43).

Al parecer, sólo los antígenos externos de *Leishmania* pueden alcanzar el citosol del macrófago. Es posible que sean moléculas que el parásito secreta y no productos de la degradación fagolisosómica. Otra vía de transpresentación de antígenos exógenos implica la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de células infectadas por parte de las DC (**Fig. 10**).

Figura N° 10. Procesamiento de antígenos de Leishmania mediante MHC I (Mecanismo indirecto).



Fagocitosis de cuerpos apoptóticos. (43)

Luego de fagocitar cuerpos apoptóticos, las DC adquieren la capacidad de presentar los antígenos que se hallan en dichas células. Los antígenos deben ingresar al citosol para interceptar la vía convencional de MHC I. De igual modo, se sabe que son las células dendríticas, y no los macrófagos, las que tienen la capacidad de migrar a nódulos linfoides y presentar antígenos de manera eficiente. En lesiones de pacientes con la forma *Leishmania* cutánea difusa (LCD) se ha identificado un gran número de macrófagos parasitados, mientras que en sujetos con LCL el número de macrófagos disminuye. (43)

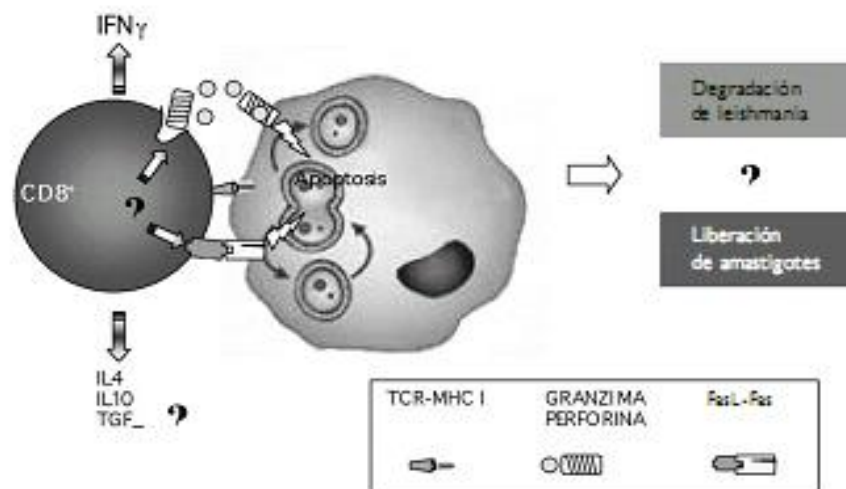
2.8.4.4.2.- Función efectora de las células T CD8+

La principal función protectora de los linfocitos T CD8+ es contribuir con la producción de IFN γ . Dado que *Leishmania* es un parásito intracelular, es plausible pensar que la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+ podría coadyuvar a controlar la infección a través de la lisis de macrófagos infectados por la vía de

granzima/perforina o Fas/FasL, o ambas. Experimentos recientes realizados con células mononucleares de sangre periférica humana han demostrado que la infección por *L. major* se correlaciona con la producción de $IFN\gamma$ apoyado por IL-12, lo cual precipita una respuesta Th1 (9)(34). IL-10 se presenta en baja cantidad y al parecer regula la producción de $IFN\gamma$. El porcentaje de células T CD8+ no se altera luego de siete días de exposición a *Leishmania*.

Esto señalaría que la activación de linfocitos T CD8+ es vital en la producción de $IFN\gamma$. Si se piensa en la capacidad heterogénea de los linfocitos T CD8+, es posible que también intervengan en la cronicidad de la infección, no sólo al exacerbar el daño en el tejido, como en el caso de la LMC por *L. braziliensis*, sino al originar citocinas inhibitoras como IL-10 o $TGF\beta$ (Fig 11), que podrían generar un estado anérgico ante grandes cantidades de antígeno, como se ha sugerido en el caso de la LCD.

Figura N°11. Posibles mecanismos efectores de los Linfocitos CD8+ en la Leishmaniasis.



Se señalan tres interrogantes que hacen referencia al mecanismo de citotoxicidad, el destino de los parásitos intracelulares y la posibilidad de producción de citocinas inhibitoras. (43)

Estos procesos son complejos y están relacionados con la contención de respuestas patogénicas generadas por exacerbación de la respuesta celular a través de IFN γ (43),(56),(57)

2.9 Galipea longiflora Krause (Evanta)

La especie medicinal *Galipea longiflora* K. (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki) tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta (Tabla N°3).

Pertenece a la familia Rutaceae, es un árbol que crece hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un pecíolo frecuentemente alado y sus flores aparecen en forma de racimos. En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos de Beni y La Paz. (7)

2.9.1 Medicina Tradicional

Esta especie se encuentra registrada en farmacopeas tradicionales, como planta medicinal en la cura de la “lepra blanca” (*Leishmania*), así como también problemas digestivos como ser parasitosis intestinales. Esta sintomatología puede ser interpretada por la medicina occidental, como antiparasitaria (leishmanicida). Esta planta es usada de manera tradicional por las etnias Tacana, Mosekene y Tsimane. (5-9).

El uso tradicional más frecuente según los Tacanas es en forma de cocción para el tratamiento de diarreas causadas por amebas o parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos; para el tratamiento de la Leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente en forma de cataplasma sobre las úlceras, dos veces al día hasta que sane, además de beber la decocción.

Tabla N° 3

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

Clasificación taxonómica de Evanta (7)

3 ANTECEDENTES

3.1 Estudios Científicos

Entre los años 1985-1991, en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA) dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), un grupo de investigadores Franco-Boliviano estudiaron la actividad antiparasitaria de los extractos de la *Galipea longiflora* (Evanta) (58-61), hojas, raíces y corteza, aislándose e identificando 12 alcaloides quinoléicos (59). Algunos de estos alcaloides presentes en hojas resultaron eficaces y con baja toxicidad in vivo, por lo que fueron patentados (**Chimaninas A, B, C y D US4209519/15/04/93**) con el fin de atraer a las empresas farmacéuticas y conseguir apoyo para continuar con los estudios (60), (61), (62), estrategia que a la fecha no ha dado ningún resultado tangible.

Fournet y colaboradores (1993) **(59)** demostraron la actividad leishmanicida del extracto de corteza de tronco, corteza de raíz y hojas, de *Evanta* a una concentración de 100ug/mL.

Fournet y colaboradores (1996)**(61)** demostraron reducciones en el tamaño de lesiones cutáneas en un 74%, además de una disminución de la carga parasitaria del 90% en ratones Balb/c por parte de la **Chimanina B** a una concentración de 50mg/kg peso, en la infección de estos con *L. amazonensis*, proponiéndose esquemas de tratamientos con **Chimanina D** que presentó una reducción de la carga parasitaria (87%), en órganos con el empleo de una concentración de 100mg/kg peso.

Destacando también que con una concentración de 94 mg/kg peso de la 2-n-propilquinolina se obtuvo una reducción de la carga parasitaria de *L. visera*l en hígado de un 99.9% en un modelo experimental con referencia al tratamiento convencional con Glucantime que reduce la carga parasitaria en un 98% a una concentración de 100mg/kg peso, por vía subcutánea.

Ríos y col. **(62)** demostraron que el aceite esencial de manzanilla presentó actividad contra amastigotes intracelulares, pero no con amastigotes exénicos, siendo a futuro un candidato a estudios para la formulación de nuevos medicamentos.

Polonio y Efferth**(63)** demostraron que la molécula de 10-deaacetilbaccatin III, aislada a partir de *Taxus baccata* (Taxaceae) presentó inhibición similar al Glucantime en el crecimiento de promastigotes así como de amastigotes de *L. donovani*, por vía sub dérmica.

Son destacables los estudios farmacológicos realizados en Bolivia en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), sobre los extractos crudos de corteza del tronco, de la raíz, así como de las hojas de *Galipea longiflora*, de donde se aislaron alcaloides 2-aril y 2-alquil quinolínicos, mostrando diferentes porcentajes de actividad leishmanicida; entre estos la 2- fenilquinolina es la molécula que presentó mayor actividad, además que demostraron que se

encontraba en mayor proporción en extractos crudos (Tabla N°7) , de esta manera se ha propuesto a *EAE* como nueva alternativa para el tratamiento de la Leishmaniasis frente a *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. donovani*. **(7)**

La corteza de *Galipea longiflora* fue colectada, en la provincia Sud Yungas del Departamento de La Paz, Bolivia. Su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con muestras Vaucher (AS49 mayo de 1996 y SD17 septiembre de 1994) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia. **(5)**

Además de la realización de estudios biodirigidos, para resolver incógnitas con el fin de explotar las propiedades curativas de *Galipea longiflora* (Krause) Evanta, desarrollaron formulaciones farmacéuticas, tópica y sistémica, a base de los alcaloides totales de corteza de la Evanta, sus resultados indican que debido a su potente actividad leishmanicida **(62)**, se pudo inferir que su uso popular por las etnias Tacana, Chiman y Mosetene como alternativa en el tratamiento de la Leishmaniasis no evidencia toxicidad por vía oral. **(64)**

Basados en el conocimiento tradicional y estudios científicos que demostraron que el extracto crudo de Evanta tiene actividad antiparasitaria, en el Instituto SELADIS, Calla-Magariños, J. y col. **(9)** realizaron estudios Inmunológicos, demostrando inicialmente que la concentración de 50ug/mL resultó tóxica para los cultivos celulares, con la sugerencia de disminuir dicha concentración para los siguientes estudios, posteriormente se verificó que el uso de una dosis de 10 ug/mL mantuvo un efecto fuerte sobre el crecimiento del parásito, resaltando que a esta concentración EAE no afecta la viabilidad de las células eucariotas

Se realizaron estudios sobre los efectos de EAE en la activación celular de esplenocitos murinos, así como sobre monocitos de sangre periférica humanos, encontrando que a una concentración de EAE de 25 ug/mL, la proliferación fue afectada, confirmando una vez más que 10 ug/mL era la concentración óptima para los siguientes estudios. **(8)**

Se testearon los efectos de EAE sobre la inducción de la producción policlonal de IFN γ en esplenocitos murinos y sobre monocitos de sangre periférica humanos, utilizando dos diferentes activadores de células T, en que la producción de IFN γ de las células murinas, presentó un descenso, mostrando efectos más evidentes en células que recibieron un pretratamiento con EAE, mostrando resultados inesperados en la respuesta inmune. **(8)**

Se investigó los efectos de EAE sobre la reactivación específica de linfocitos con *Leishmania braziliensis*, encontrando que con un pretratamiento la reestimulación fue afectada, llevando la investigación a un test in vivo de los ratones, recibiendo un tratamiento con EAE post infección, para reestimar sus células esplénicas in vitro, encontrando que estas presentaron un descenso en la producción de IFN γ , al igual que aquellas que no recibieron tratamiento. **(8)**

Se probó el antimoniato de meglumina (SbV) en los modelos de investigación plateados, observando que la presencia de esta molécula, así como la combinación del tratamiento de EAE con SbV, no difiere del que presenta EAE solo, indicando que no existe una sinergia o antagonismo entre ambos no teniendo efectos en la reactivación de células por antígeno-específico. **(8)**

Se verificó in vivo el hecho que EAE podría controlar la infección, con ratones BABB/c infectados con *L.braziliensis* un componente de la saliva del flebótomo implicado en el proceso natural de la leishmaniasis, que presentaron un proceso inflamatorio severo a los pocos días, produciendo la sensibilización de las células T, con la consiguiente producción de IFN γ y TNF (la mayor citoquina presente en esta patogénesis), acompañada de la expresión de citoquinas quimioattractantes; la administración de EAE, promovió a que los ratones controlen eficientemente la reacción inflamatoria, pero no así la carga parasitaria, suceso inverso al efecto de SbV. **(8),(65)**

Se utilizaron células dendríticas consideradas el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que juegan un papel muy importante para la estimulación de la respuesta humoral o celular, estas fueron cultivadas observándose que por

medio de un cocultivo con células T se obtuvo una activación masiva en presencia de las células dendríticas, paralelamente la administración de EAE, no afectó la expresión de varios marcadores de activación de células T, pero las células T presentaron bajos niveles de $IFN\gamma$, entendiéndose que la reducción de la producción de $IFN\gamma$ por las células T se debió a la disminución de la habilidad estimulante de las células dendríticas en presencia de EAE.(8)

Se estudió de la expresión del gen de $IFN\gamma$ por el método TR-PCR, en células murinas en presencia de EAE(67) como la producción de esta glucoproteína inducida por Concavalina (Con A) por esplenocitos murinos al igual que por células mononucleares humanas de sangre periférica, (66,8) presentó una disminución, al ser pre- tratadas con EAE, sugiriendo que dicho extracto, podría ser considerado como un tratamiento alternativo en casos de Leishmaniasis (8), esta interesante observación fue ampliada por Quispe,E.(68) que realizó el estudio sobre el efecto de EAE en la capacidad infectiva y microbicida de macrófagos murinos infectados con promastigotes de *L.braziliensis*, encontrando que EAE a una concentración de 10ug/mL actúa sobre la capacidad infectiva de los parásitos, ejerciendo un control de la infección en sus formas promastigote y amastigote, y que la capacidad microbicida se mantiene efectiva aún a las 72 horas post infección, atenuando los mecanismos de evasión del parásito.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Factores como los lugares de transmisión muy dispersos, casos no diagnosticados o diagnóstico erróneo y medicamentos específicos no disponibles permiten que no se llegue a conocer de manera precisa la realidad y la magnitud de la enfermedad de la *Leishmaniasis* que a su vez representa un freno al desarrollo, retrasando y deteniendo proyectos agrícolas e industriales.

En cuanto a los tratamientos quimioterapéuticos frente a esta enfermedad, los compuestos de antimonio pentavalente, como el Estibogluconato de sodio (Pentostam®, Laboratorios GSK), el antimoniato de meglumina (Glucantime® Laboratorios Aventis) y otros, constituyen desde hace aproximadamente 70 años el tratamiento de primera elección, pero resultan con severos efectos secundarios por la toxicidad que presenta, pues son administrados por vía parenteral. Desde hace quince años se vienen reportando fallas terapéuticas en algunas regiones de India, Sudán y Etiopía, (69),(70) razón por la cual se han hecho ajustes en las dosis diarias y en el tiempo de administración con lo que se ha logrado mantener su eficacia pero con el inconveniente del incremento en la frecuencia y seriedad de los efectos secundarios, (71),(72) siendo necesario acompañar éste con un monitoreo clínico estricto, además de pruebas de laboratorio que ayudan a evaluar tanto las funciones renales, hepáticas, cardíacas y hematológicas.

Independientemente de sus efectos adversos. La OMS recomienda que la dosis del antimonial sea hasta un máximo de 850 mg/día. Los expertos, basados en experiencias de campo, recomiendan usar la dosis de **20 mg/Kg/día** para minimizar la resistencia y las recaídas, lo que constituye es un riesgo para la salud de los pacientes y resulta muy complicado, pues su acceso es limitado. Como fármacos de segunda elección están la anfotericina B y la pentamidina, pero se considera que estos compuestos producen efectos tóxicos severos e irreversibles. (72)

El traumatismo secundario a la picadura del vector con la inoculación de promastigotes dentro la dermis, induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que supone la migración y reclutamiento de diferentes células, en especial macrófagos y linfocitos, hacia el sitio de la lesión con el fin de reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización, **(1)**, y los flagelados promastigotes para escapar de la respuesta inmune inespecífica del huésped vertebrado penetran en los macrófagos principalmente por el polo flagelar. **(73)**

La capacidad de *Leishmania* para invadir los macrófagos es de gran interés para los investigadores, así como el estado de maduración y la activación de la célula hospedera al momento de contacto con los parásitos, que puede ser determinante para la infección que se avecina llamado *desarrollo de la infección* o un *proceso asintomático*; así como también la especie de *Leishmania* que interviene en el proceso infeccioso, por tanto la forma clínica de la enfermedad y su cronicidad, presentan un espectro de respuestas inmunitarias, desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica a través de células y anticuerpos.

En este trabajo se modificó la realidad en pos de recrear los eventos del establecimiento de esta enfermedad, planteando un cultivo *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Leishmaniasis, las cuales fueron diferenciadas a macrófagos,**(73)** que son las células implicadas en la eliminación final del parásito, controlando variables así como la administración de EAE,**(68)** el momento de la infección, la carga parasitaria, la población celular que sufrió la infección, el tiempo de administración de EAE y el tiempo de exposición celular a la infección; estos macrófagos, cursaron este proceso en presencia de EAE, así como en ausencia de EAE a modo de control para su referencia, pudimos obtener entonces datos que nos ayuden a evaluar el efecto de EAE sobre la capacidad infectiva de los parásitos, así como sobre la capacidad microbicida de los macrófagos.

5. JUSTIFICACION

La parasitosis producida por *Leishmania* en humanos se relaciona directamente con las actividades ocupacionales, tanto en el bosque primario, donde existe mucho contacto entre el hombre y el vector, así como también en lugares donde se producen nuevos asentamientos, y las personas viven rodeadas de animales domésticos, que llegan a ser reservorios secundarios, incrementando de esta manera la probabilidad de contraer esta enfermedad.

En Bolivia la colonización de nuevas tierras del trópico por colonos que en su mayoría se trata de personas del occidente de muy bajos recursos, que con el fin de cultivar la hoja de coca o en su defecto realizar cultivos alternativos, ingresan a bosques o selvas para cosechar la castaña o chaquear, haciendo el desmonte de áreas que albergan ecosistemas que incluyen a aquellos reservorios del ciclo de este parásito.

Debido a que el tratamiento convencional de esta afección conlleva muchos factores, ya sean la falta de apego al tratamiento, la dolosa administración de los fármacos, sumado a los efectos secundarios devastadores que presentan, así como la dificultad de conseguirlos y ni hablar del costo que esto significa, promueven a que esta patología sea difícil de controlar y quizá llegar a solucionar.

Las plantas medicinales tienen un gran potencial terapéutico, se constituyen en una parte importante de productos naturales, para mitigar las enfermedades propias, principalmente de los países en vías de desarrollo.

Identificando el valor curativo de las plantas que constituyen nuevas alternativas de medicina proporcionada por el saber tradicional de los pueblos originarios (7), quienes nos brindan un conocimiento ancestral de comunidades que pudieron combatir distintas patologías desde hace muchos años así como es el caso de la Leishmaniasis, información que ha sido fuente para la investigación fitoquímica, la identificación de principios activos y en algunos casos para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (5).

En Bolivia han sido estudiadas una amplia variedad de especies vegetales con propiedades medicinales, de las que se recopiló información a partir del conocimiento tradicional proporcionado por grupos étnicos, como es el caso de la especie **Angostura longiflora (Krause) Evanta**, planta medicinal antiparasitaria conocida por las etnias: Tacana, Mosekene y Tsimane, a quien se le atribuye propiedades terapéuticas sobre la Leishmaniasis. **(65)**

La validez del modelo planteado obedeció a la repetición de los resultados en función al análisis estadístico, lo que llevó a concluir que el extracto oleoso de la corteza de la Evanta, administrado a ratones albinos de la cepa BALB/c por vía oral no evidenció toxicidad significativa, demostrado por un estudio histopatológico en el que no existió daño en los órganos diana expuestos en el tratamiento subcrónico a una concentración de 5g/kg. **(5)**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el propósito de complementar estos conocimientos, a partir del estudio en una población de pacientes con Leishmaniasis, quienes permitieron la experimentación en sus células con EAE, para beneficio de la comunidad científica, brindando nuevas luces que permitan dilucidar mejor el actuar de esta alternativa de tratamiento tan prometedora como es el Evanta, para la formulación de nuevos esquemas terapéuticos que pueden llegar a tener mejores resultados en las personas que padecen Leishmaniasis

Utilizamos como principal protagonista a aquellas células en quienes se cumple el ciclo parasitario de Leishmania por excelencia que son los macrófagos, provenientes de células mononucleares de sangre periférica de origen humano, quienes fueron sometidos a procesos de infección, y administración de EAE *in vitro*, entendiendo que este extracto, llegaría a actuar sobre la actividad fagocítica de los macrófagos infectados con promastigotes de *L. braziliensis*, dilucidando la incógnita de que si esta opción terapéutica es puramente antiparasitaria, o es un agente inmunomodulador, como plantean los investigadores del laboratorio de inmunología del Instituto SELADIS. **(8)**

6 OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto del extracto de alcaloides totales de la *Galipea longiflora* (*Angostura longiflora* (Krause) Kallunki) Evanta, sobre la actividad fagocítica de macrófagos humanos infectados con *Leishmania braziliensis*, octubre de 2010 y abril de 2011

6.2. Objetivos específicos.

- Estandarizar la técnica de cultivo y maduración *in vitro* de macrófagos humanos a partir de células mononucleares de sangre periférica en el laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS.
- Hallar diferencias en el índice de infectividad en cultivos de macrófagos humanos infectados con promastigotes de *L. braziliensis* entre el grupo control y los de tratamiento con EAE a diferentes tiempos.
- Verificar la influencia de la administración de EAE a diferentes tiempos sobre la capacidad infectiva de promastigotes de *L. braziliensis*, en cultivos de macrófagos humanos derivados de células mononucleares de sangre periférica
- Comparar la influencia de la administración de EAE a diferentes tiempos sobre la capacidad microbicida de macrófagos humanos cultivados a partir de células mononucleares de sangre periférica
- Analizar las diferencias de los índices de fagocitosis, en el transcurso del tiempo, en cuanto al momento de la administración de EAE a macrófagos humanos infectados con promastigotes de *L. braziliensis*.

7 MATERIALES Y METODOS.

7.1 Diseño o tipo de estudio.-

Se planteó en esta investigación un diseño experimental de tipo cuantitativo

7.2 Lugar de estudio.-

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

7.3 Materiales.

7.3.1 Equipos.

- Campana de flujo laminar (Envirco Lw Scientific Inc)
- Centrifugadora (Eppendorf 5810)
- Estufa (Fisher Scientific – Isotemp Incubator 655D)
- Microscopio (Olimpus CH-2)
- Balanza (Gibertini Italia)

7.3.2 Reactivos

- Medio de cultivo RPMI 1640
- Medio DMEN (Sigma)
- Medio de cultivo M-199 (Sigma)
- EAE
- HEPES (Sigma)
- Recombinant Human GM-CSF (BIOSURCE)
- Bicarbonato de Sodio
- Glutamina (Gibco)
- Penicilina Streptomycin (Gibco)
- Suero Fetal Bovino (Sigma)
- Piruvato (Gibco)
- Adenina (Sigma)
- Hemina (Sigma)
- Biotina (Sigma)
- Biopterina (Sigma)
- Solución PBS

- Solución Dextrán 70 (INTI)
- Solución fisiológica (0.9%)
- Giemsa-Stain-Modified (Sigma)
- Azul tripán
- Ácido clorhídrico 1N
- Alcohol 70

7.4 Material biológico

Se trata de pacientes reclutados que comprendieron un número determinado arbitrariamente de 30 pacientes, nuevos, de ambos sexos, con criterios de inclusión y exclusión, atendidos por la consulta externa del Hospital de Palos Blancos–Departamento de Parasitología- *Leishmania* –La Paz, Bolivia, entre los meses de octubre de 2010 y abril de 2011.

7.5 Métodos.

7.5.1 Criterios de inclusión para la delimitación del universo:

- Pacientes nuevos atendidos por consulta externa del Hospital de Palos Blancos – Departamento de Parasitología- Leishmaniasis – La Paz Bolivia entre los meses de octubre de 2010 y Abril de 2011
- Pacientes que hayan otorgado su participación a través de la firma del consentimiento informado.
- Pacientes que presenten una evolución de la enfermedad mayor a 1 mes y menor a 7 meses
- Pacientes mayores comprendidos entre las edades de 19 y 45 años.
- Pacientes que fueron diagnosticados con Leishmaniasis por el examen en fresco (directo).
- Pacientes de ambos sexos

7.5.2 Criterios de exclusión para la delimitación del universo:

- Los pacientes que hayan recibido anteriormente un tratamiento con Glucantime, Anfotericina B, o Miltefosina.
- Pacientes reincidentes
- Pacientes que en su historial clínico padezcan afecciones cardíacas, renales, hepáticas

7.6 Aislamiento y preparación de macrófagos

7.6.1 Cultivo celular de macrófagos

Se aislaron células mononucleares a partir sangre periférica (20 mL) de pacientes con Leishmaniasis, por punción venosa antecubital, anticoagulada con heparinato de sodio, procedimiento descrito por Arce y col,(74) que se siguió para cada uno de los pacientes del estudio.

La sangre se estratificó, utilizando Ficoll Hypaque en una relación (2:1) y centrifugada (1400 rpm- 20min) a 4°C. Las células fueron lavadas con solución fisiológica (0,9%) y con medio RPMI 1640 por triplicado, para eliminar metabolitos que pudieran interferir en el proceso de investigación, manteniendo las condiciones de micro ambiente controladas. (40)

Se realizó el recuento de las células en cámara de Neubauer, utilizando microscopio óptico (10X), la viabilidad se mantuvo mayor al 95%, determinada por exclusión de colorante (Azul Tripán - 1:10), Se cultivaron los mononucleares en medio RPMI 1640, se añadió el factor estimulante de colonias granulocíticas, monocíticas (GM-CSF) 20ng/mL.

Se suplementó con 10%de Suero Bobino Fetal (FBS) y L-Glutamina 2nM, más la adición de persevantes como penicilina 100UI/mL, estreptomycin 100ug/mL.(40) El ajuste poblacional se calcula para un total de 1.5 x10⁷ células/6mL, el cultivo se lo realizó en microplacas de 24 pozos conservadas a

37°C, en ambiente húmedo (90%) con CO₂ al 5% durante 5 días, realizándose recambios del medio cada 24 horas.

7.6.2 Cultivo de *Leishmania braziliensis*

Se utilizaron promastigotes de *Leishmania braziliensis* (WHO-2305), que fueron cultivados en Medio-199 suplementado, procedimiento descrito por Quispe, E. (68). El crecimiento *in vitro* de los promastigotes de *Leishmania* al cabo de 5 días (Anexo N°6), alcanzó la fase estacionaria (Fig. N°12), fueron lavados y resuspendidos, para ser ajustados a la densidad celular de trabajo (3x10⁸ células/6 mL)

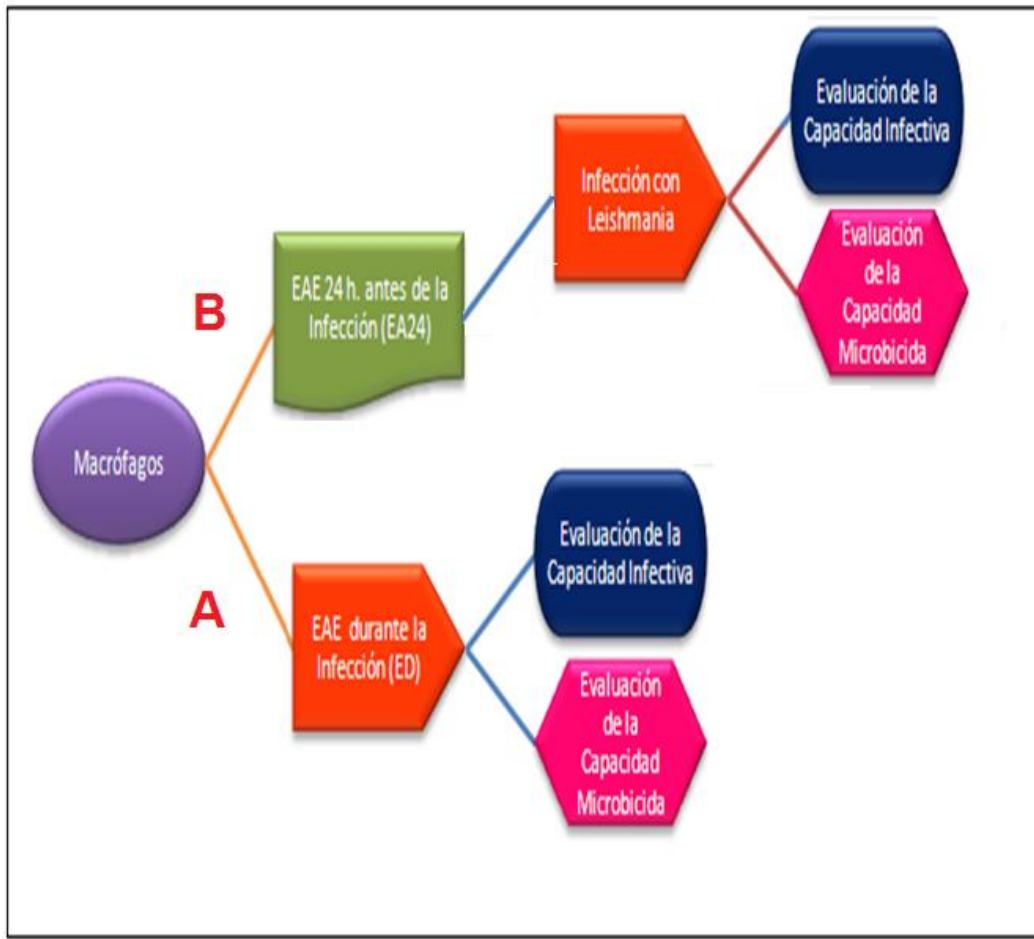
7.6.3 Preparación de EAE

El EAE fue obtenido en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas- IIFB, este extracto se utilizó a una concentración de 50ug/mL en Medio DMEN concentración establecida en anteriores estudios.

7.7 Infección de macrófagos con *Leishmania braziliensis* en presencia y ausencia de EAE

En la infección de macrófagos, se trabajó a partir de la placa de cultivo donde se encontraban los macrófagos maduros de acuerdo a los cambios que presentaron en tamaño y forma, se añadió a los pozos 1 mL de **medio DMEN suplementado**, que contenía parásitos en una relación 1:20, y se incubó por 24 y 72 horas este procedimiento y administración de EAE se detalla en el siguiente flujograma:

7.7.1 Flujo de proceso de infección y administración de EAE en macrófagos



*Se inició con la obtención de macrófagos a partir de células mononucleares de sangre periférica; (A) se administró EAE al momento de la infección con promastigotes de *L. braziliensis* y se evaluaron las capacidades Infecciosa y microbicida. (B) Se realizó la variante de administración de EAE 24 horas antes de la infección y se evaluaron las capacidades infecciosa y microbicida. (Fuente elaboración propia)*

7.8 Análisis estadístico.

Para tener una descripción más completa, se codificaron los datos, resumiendo y eliminando datos irrelevantes, realizando así un análisis cuantitativo, generando un mayor sentido de entendimiento del material analizado.

Dividimos en tres grupos:

7.8.1 Grupo Control.- Macrófagos infectados con *L. braziliensis*, que no recibieron tratamiento, preparados para su evaluación a las 24 y 72 horas post infección lavándose el excedente de parásitos no fagocitados y siendo mantenidos en medio RPMI 1640.

7.8.2 Grupo EAE Mi.- Macrófagos infectados, a los que se administró EAE al momento de la infección, que fueron preparados para su evaluación a las 24 y 72 horas post infección con los lavados respectivos.

7.8.3 Grupo EAE 24.- Macrófagos a los que se les administró EAE 24 horas antes del proceso de infección, que fueron preparados para su evaluación a las 24 y 72 horas post infección con los lavados respectivos.

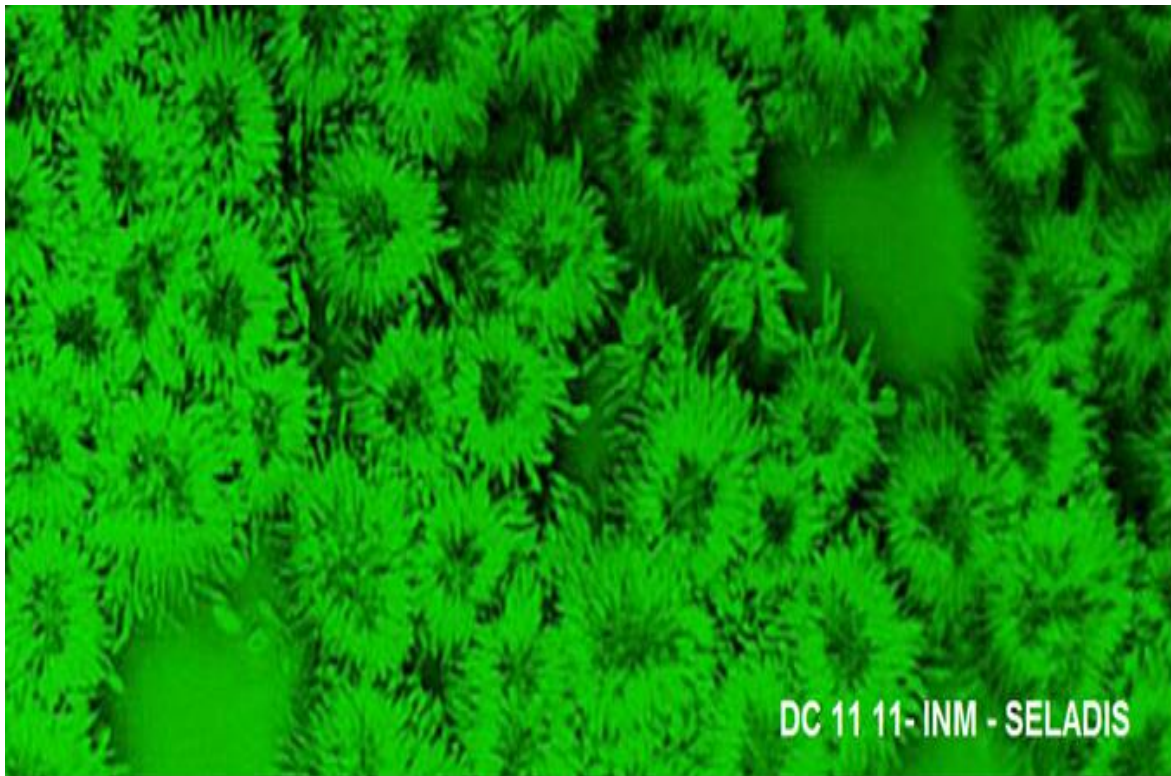
Los cubreobjetos fueron analizados al microscopio y se realizó el recuento de 400 células. Se registró el número de macrófagos que contenían parásitos en su interior así como también el número de parásitos por macrófago.

Los datos obtenidos se compararon entre sí para agruparlos y se hallaron vinculaciones que permiten clasificar nuestras unidades de análisis en categorías de análisis:

- Índice de infectividad
- Capacidad infectiva
- Capacidad microbicida
- Actividad fagocítica

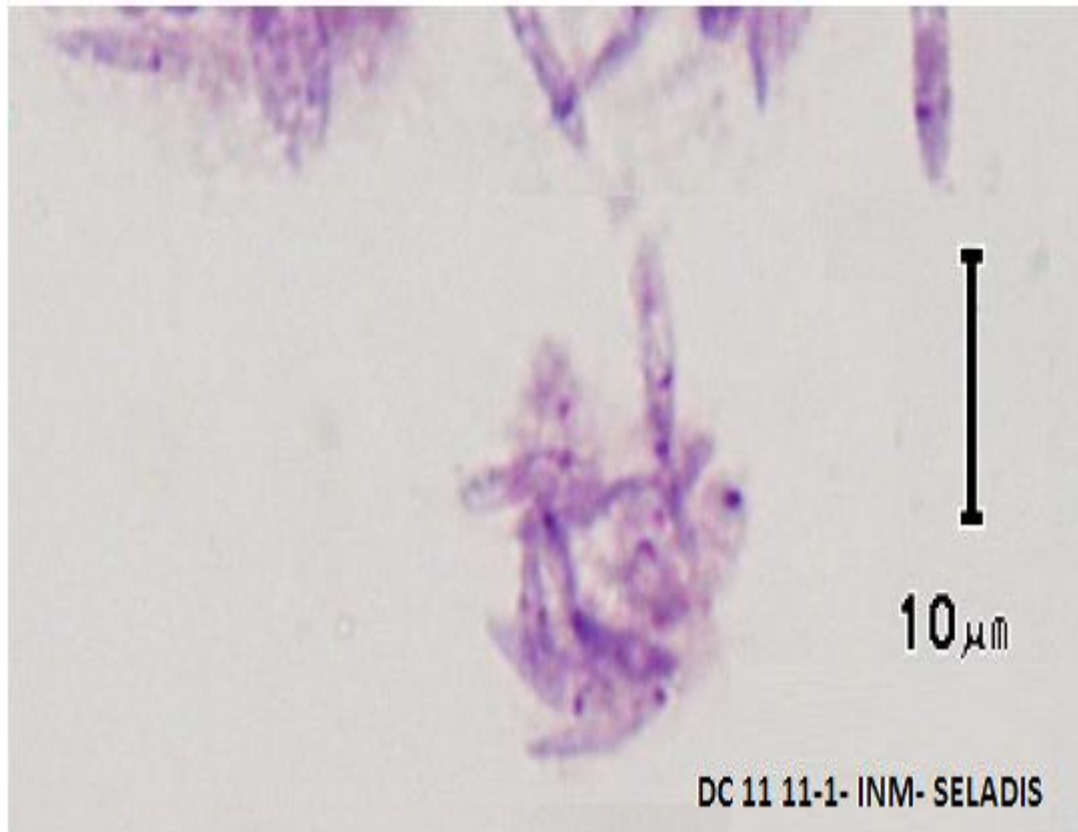
8.- Resultados.-

Figura N°12.- Cultivo celular de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, en fase estacionaria.



Cultivo celular in vitro estandarizado de promastigotes de L.braziliensis completando el ciclo de desarrollo in vitro, con la formación de rosetas, realizado en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS –UMSA .La Paz, Bolivia.

Figura N°13.- Cultivo celular de promastigotes de *Leishmania braziliensis*

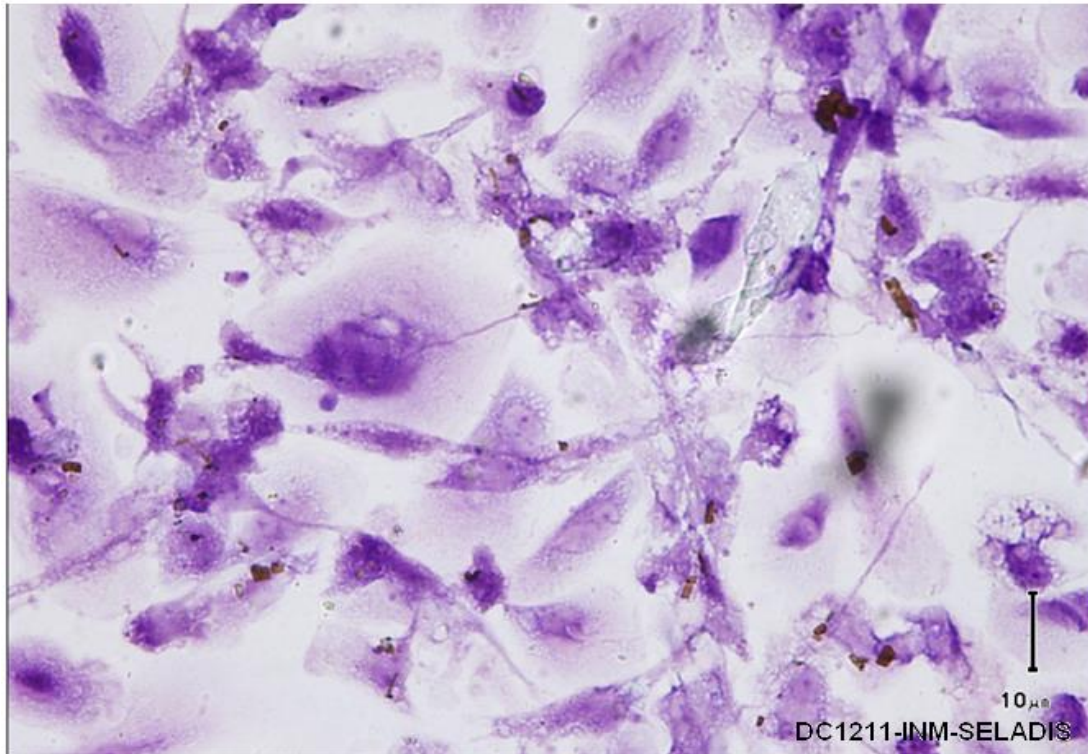


Morfología de promastigotes de L.braziliensis, realizado en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS – UMSA .La Paz, Bolivia.

8.1 Cultivo celular de mononucleares.

Se estandarizó el método de cultivo y maduración *in vitro* de células mononucleares humanas de sangre periférica en cultivo *in vitro*, en medio RPMI 1640 con la evaluación tanto de repetitividad como reproducibilidad (**Anexo N°8**) que nos permitió contar con Macrófagos maduros al cabo de 5 días.

Figura N°14.- Cultivo celular de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica



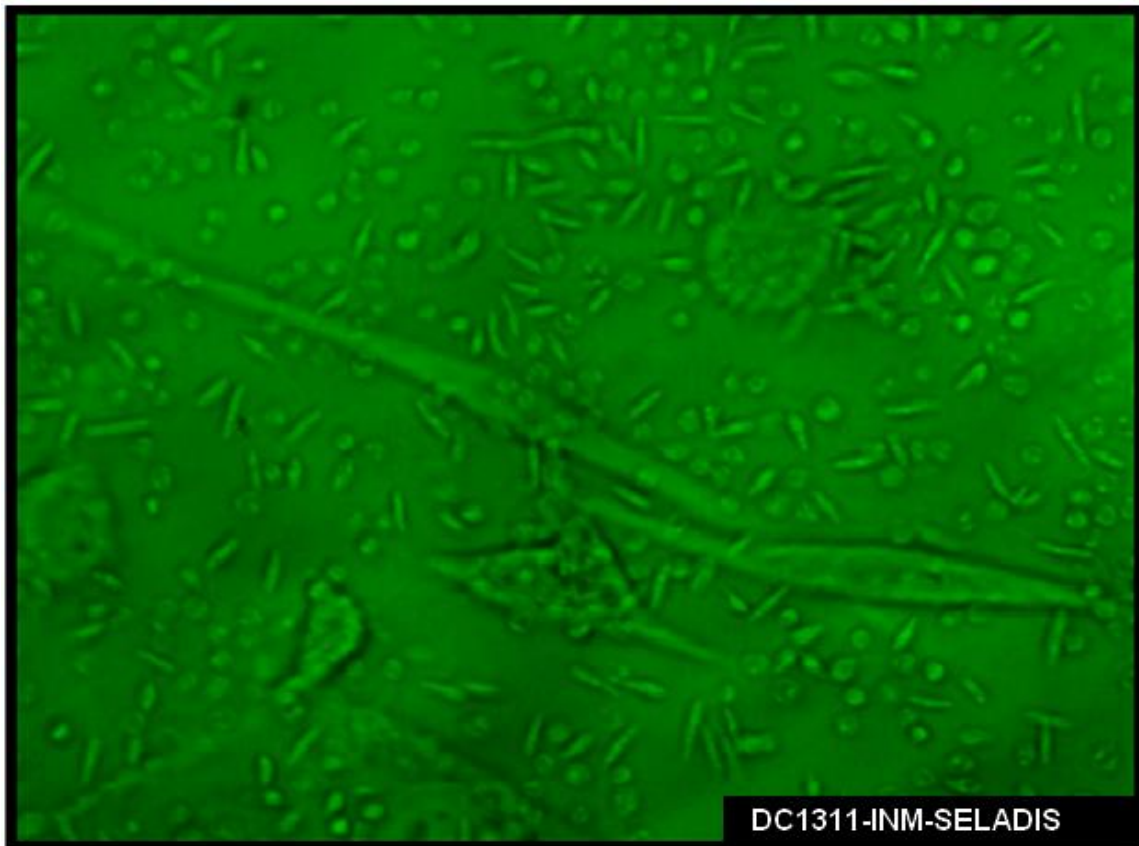
Morfología de macrófagos humanos cultivados in vitro, provenientes de mononucleares de sangre periférica realizado en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS –UMSA. La Paz, Bolivia.

8.2 Infección de macrófagos con promastigotes de *L.braziliensis*.

Las células humanas maduras (98%) obtenidas *in vitro* fueron sometidas al proceso de infección con promastigotes de *L. braziliensis*, con un ratio de 1-20 promastigotes en fase estacionaria, por 24 horas, en medio RPMI 1640, en una serie de cultivos repetidos por quintuplicado que proporcionaron una visión más completa del estudio de nuestras variables.

Se realizó el procedimiento paralelo, entre el grupo de células maduras en cultivo *in vitro* que recibieron el extracto de alcaloides totales de Evanta al momento de la infección (EAE Mi), y el grupo de células que recibieron el pretratamiento con EAE (EAE 24) de acuerdo al flujograma planteado

Figura N°15.- Cultivo celular de Macrófagos en proceso de infección, con promastigotes de *Leishmania braziliensis*

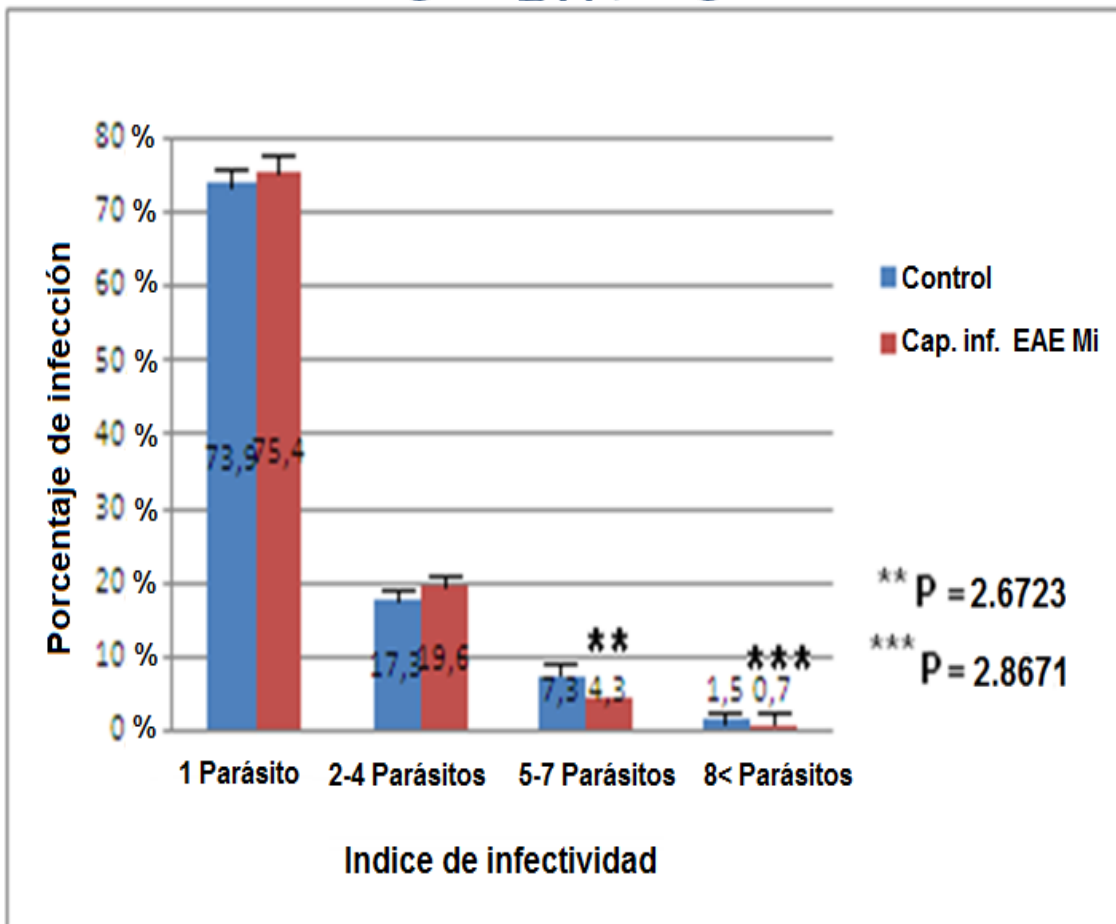


Cultivo celular in vitro de macrófagos provenientes de mononucleares humanos de sangre periférica infectados con promastigotes de L. braziliensis, realizado en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS –UMSA, La Paz, Bolivia.

8.3 Índice de infectividad.

Para estudiar el efecto de EAE sobre el índice de infectividad del parásito se evaluó de acuerdo al número de parásitos por macrófago

Figura N° 16.- Evaluación del índice de infectividad de macrófagos tratados con EAE al momento de la infección



La evaluación del índice de infectividad, del grupo de macrófagos que recibió el tratamiento con EAE al momento de la infección, presenta un comportamiento similar al control. Se cultivaron macrófagos y se les administró 50ug/mL del extracto de EAE al momento de la infección con promastigotes de *L. braziliensis*, se evaluó el índice de infectividad y se lo comparó con el control de células que no recibieron el tratamiento (**P>0,01, ***P>0,01)

Se evaluó el comportamiento celular en el proceso de infección, con grupos de variables en el índice de infectividad, que reflejaron la reducida predominancia del porcentaje de infección (**Tabla N° 4 Anexos**), de los **macrófagos tratados con EAE al momento de la infección**, referidos al grupo control que no recibió tratamiento

La variable de **1 parásito** por célula, reflejó una capacidad infectiva que presentó una diferencia mínima al control, estadísticamente no significativa ($P < 0.01$).

Comportamiento que se repitió en la variable correspondiente a **2-4 parásitos** por célula, donde tampoco se verificó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$).

Se procedió a continuación con la siguiente variable que correspondía a **5-7 parásitos** por célula, se pudo evidenciar que sí existió una diferencia estadísticamente significativa ($++P > 0.01$); y por último en la variable correspondiente a **8< parásitos** por célula también se verificó una **diferencia estadísticamente significativa** ($+++P > 0.01$).

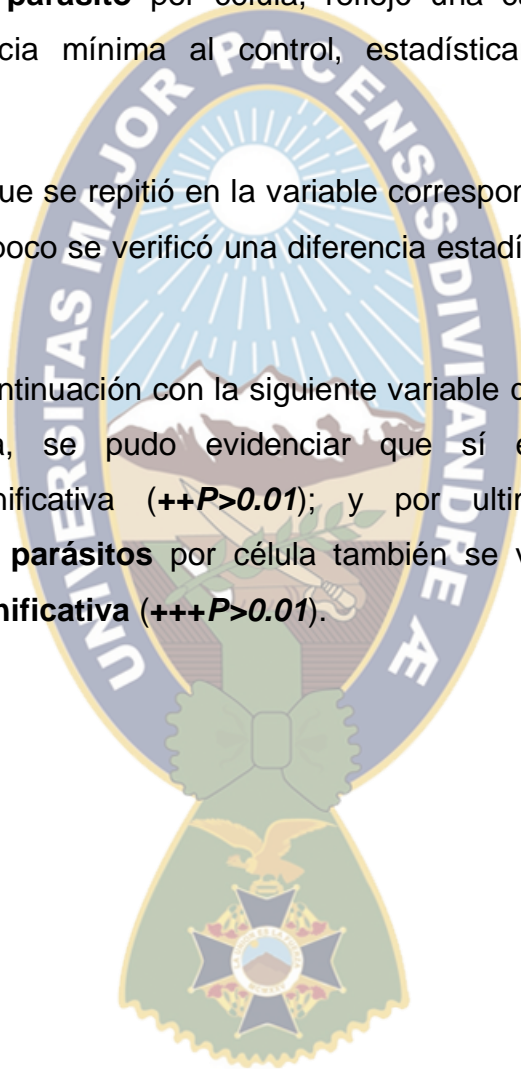
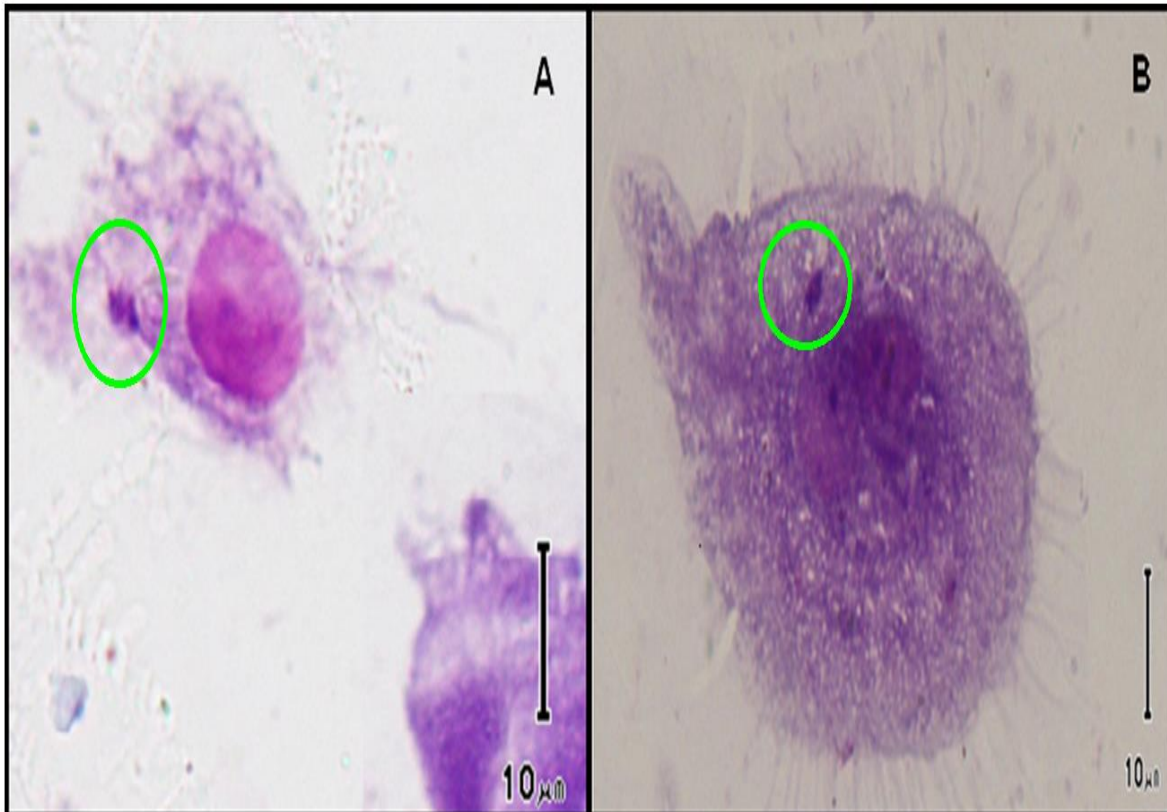


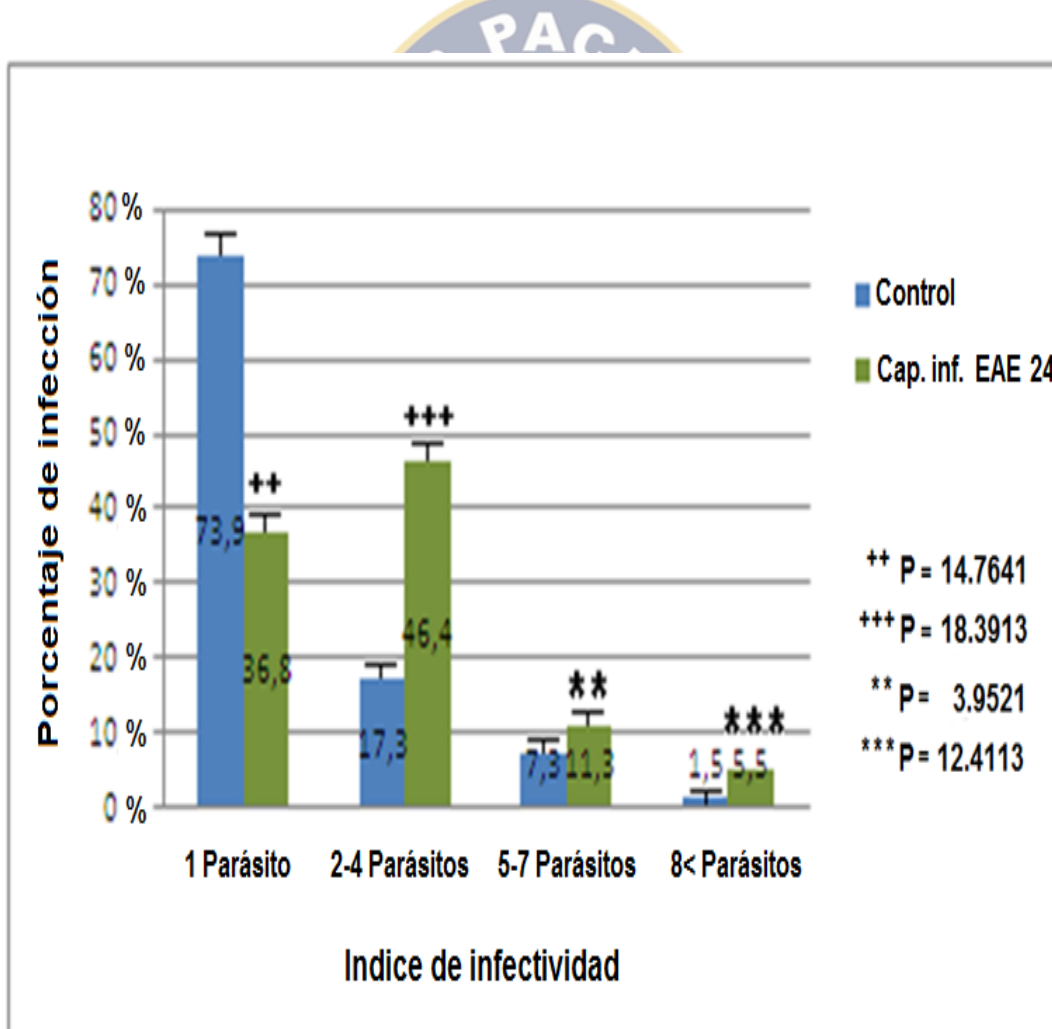
Figura N°17 Cultivo de macrófagos – índice de infectividad



*Evaluación del índice de infectividad. La figura muestra la comparación del grupo de macrófagos que recibió el tratamiento con EAE al momento de la infección (A); y el grupo de células control (B). La predominancia del índice de un parásito por célula en ambos grupos esta representada por la imagen de un macrófago maduro infectado por un promastigote de *L. braziliensis*; obtenido in vitro en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS – UMSA. La Paz, Bolivia.*

8.4 Índice de Infectividad con pretratamiento

Figura N° 18.- Evaluación del índice de infectividad de macrófagos tratados con EAE 24 horas antes de la infección



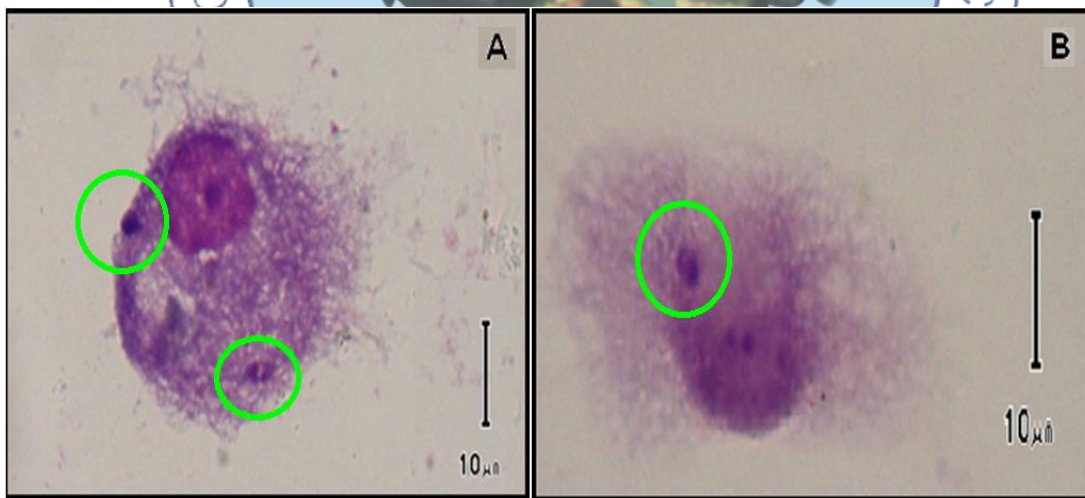
*La evaluación del índice de infectividad del grupo de macrófagos que recibió el pretratamiento con EAE, 24 horas antes de la infección, presenta un comportamiento diferente al control. Se cultivaron macrófagos y se les administró 50ug/mL del extracto de EAE 24 horas antes de la infección con promastigotes de *L. braziliensis*, se evaluó el índice de infectividad y se lo comparó con el control de células que no recibieron tratamiento. (++) $P > 0,01$, (++++) $P > 0,01$, (**) $P > 0,01$, (***) $P > 0,01$)*

En el Índice de infectividad, se observó que el grupo que recibió el **pretratamiento** con el extracto de **EAE 24 horas antes** de la infección presentó un comportamiento distinto al del grupo de células control (**Tabla N° 5 Anexos**).

Se analizó la variable correspondiente a **1 parásito** por célula en la que se encontró una diferencia estadísticamente significativa (**$++P>0.01$**), comportamiento que se repitió con las demás variables, como es el caso de la correspondiente a **2-4 parásitos** por célula, índice que resultó predominante con un **46,4%**, presentando una diferencia estadística altamente significativa (**$+++P>0.01$**).

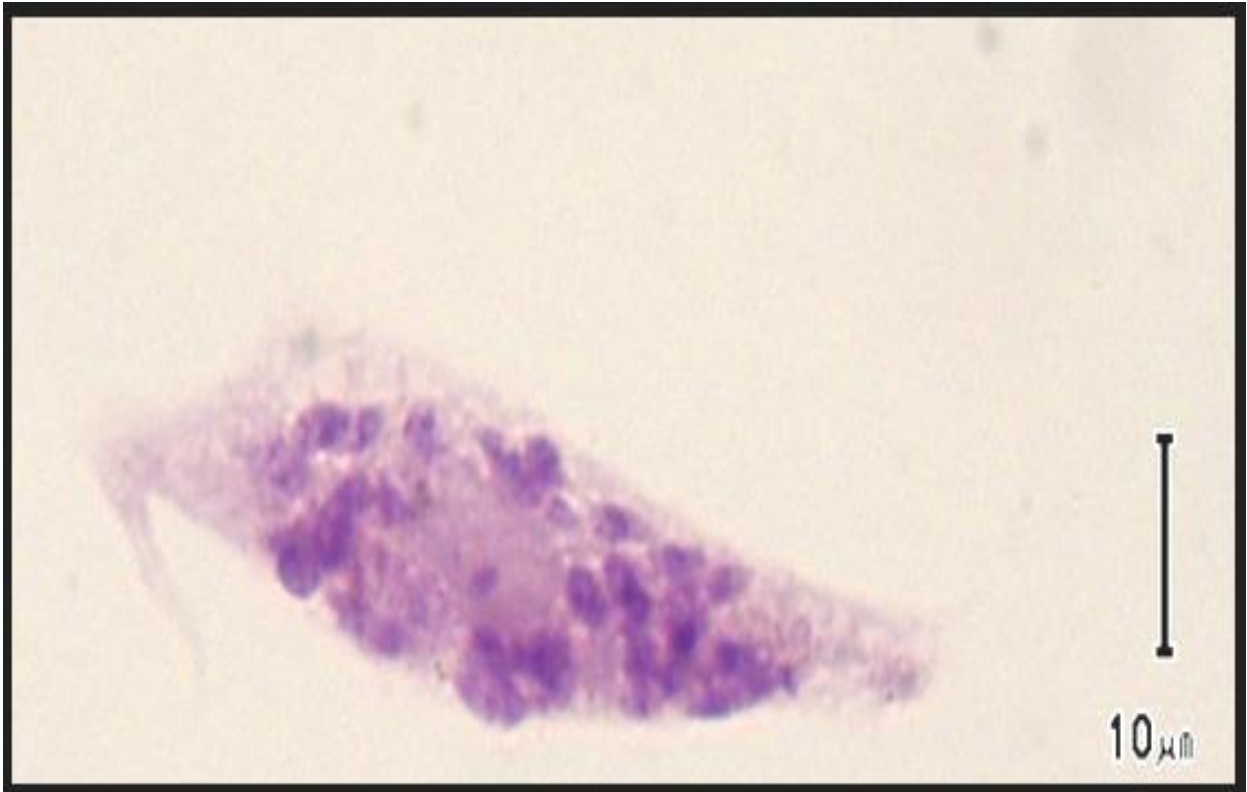
En la variable correspondiente a **5-7 parásitos** por célula, también se evidenció una diferencia estadística altamente significativa (**$**P>0.01$**), así como en la variable correspondiente a **8< parásitos** por célula, en la que se halló una diferencia estadística altamente significativa (**$***P>0.01$**)

Figura N°19.- Cultivo de macrófagos – índice de infectividad EAE 24



Evaluación del índice de infectividad. La figura muestra la comparación del grupo que recibió el pretratamiento con EAE 24 horas antes de la infección con una la variable predominante representada por la imagen de un macrófago maduro infectado por dos parásitos de *L. braziliensis* (A); y el grupo de células control en que la variable predominante, es representada por una célula infectada con un parásito de *L. braziliensis* (B). Obtenido en cultivos *in vitro* en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS - UMSA La Paz Bolivia

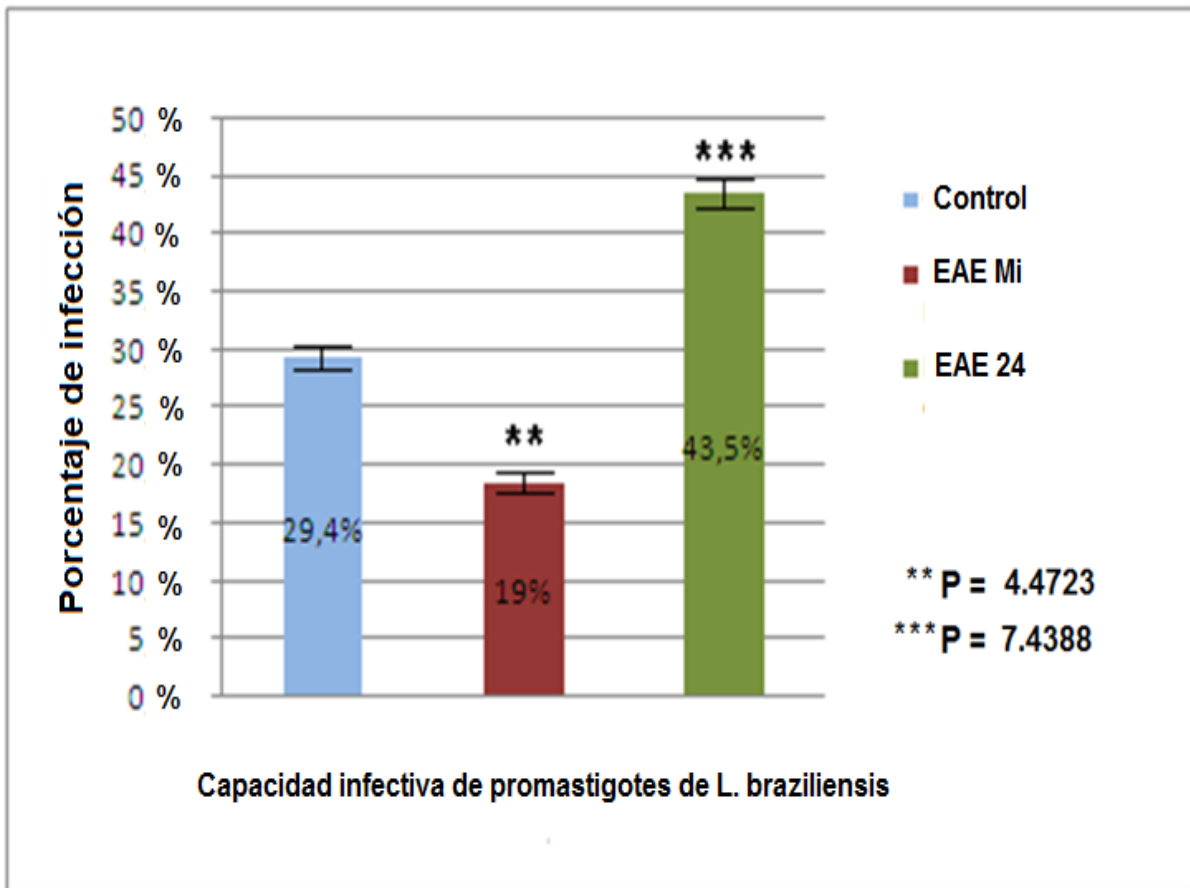
Figura N°20.- Cultivo de macrófagos – EAE 24



En el índice de infectividad del grupo de macrófagos que recibió el pretratamiento con EAE, 24 horas antes de la infección, se observa un comportamiento diferente al control, con la creciente presencia de macrófagos *infectados por mas de 20 promastigotes de L. braziliensis, obtenido en cultivos in vitro en el Laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS – UMSA. La Paz, Bolivia.*

8.5 Capacidad Infecciosa.

Figura N° 21.-Evaluación de la capacidad infecciosa a diferentes tiempos de administración de EAE.

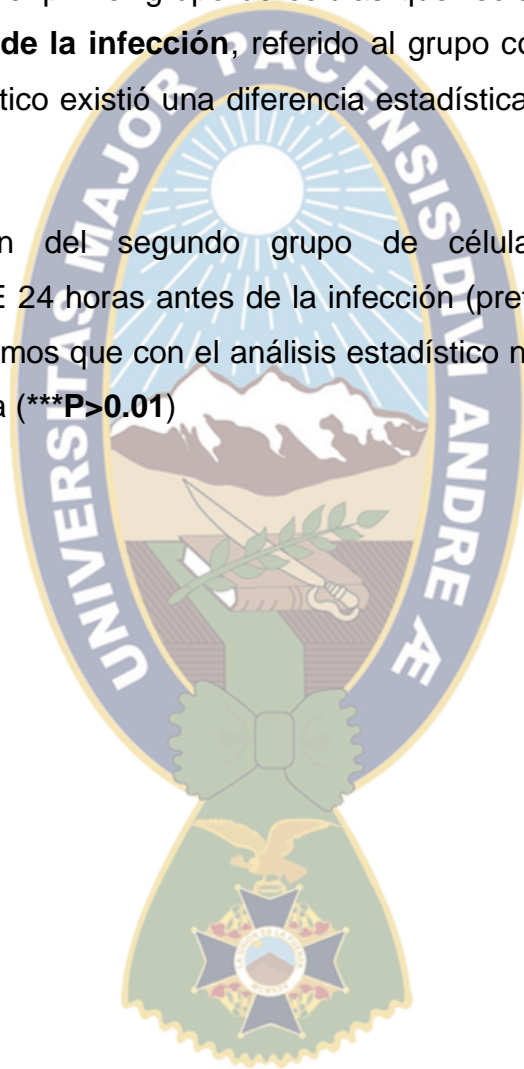


En la evaluación de la capacidad infecciosa de promastigotes de *L. braziliensis*, los grupos que recibieron la administración del extracto de alcaloides totales de Evanta EAE a diferentes tiempos presentan diferencias significativas con el control. Se evaluó la capacidad infecciosa de parásitos en el grupo de macrófagos a los que se administró 50ug/mL de EAE al momento de la infección, así como un grupo de macrófagos a quienes se administró EAE 24 horas antes de la infección (pretratamiento). (**P>0,01, ***P>0,01 versus células control que no recibieron EAE).

Se comparó la influencia de la administración del extracto EAE, en los dos grupos de macrófagos referidos al control de células que no recibieron tratamiento, utilizando los conteos de células con parásitos intracitoplasmáticos a las 24 horas post infección (**Tabla N° 6 Anexos**).

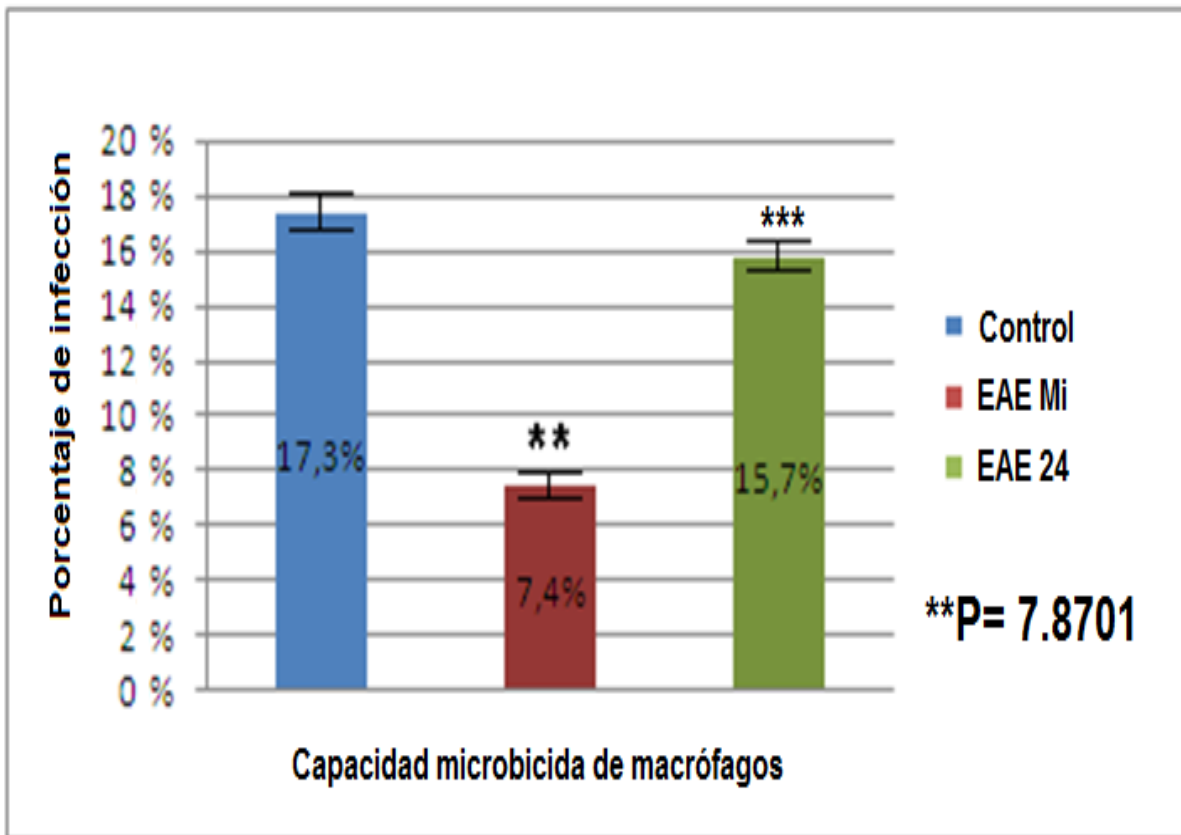
En la evaluación del primer grupo de células que recibieron la administración **de EAE al momento de la infección**, referido al grupo control, observamos que con el análisis estadístico existió una diferencia estadística altamente significativa (****P>0.01**).

En la evaluación del segundo grupo de células que recibieron la administración de EAE 24 horas antes de la infección (pretratamiento), referido al grupo control, observamos que con el análisis estadístico no existió una diferencia estadística significativa (*****P>0.01**).



8.6 Capacidad microbicida.

Figura N° 22.-Evaluación de la capacidad microbicida a diferentes tiempos de administración de EAE.

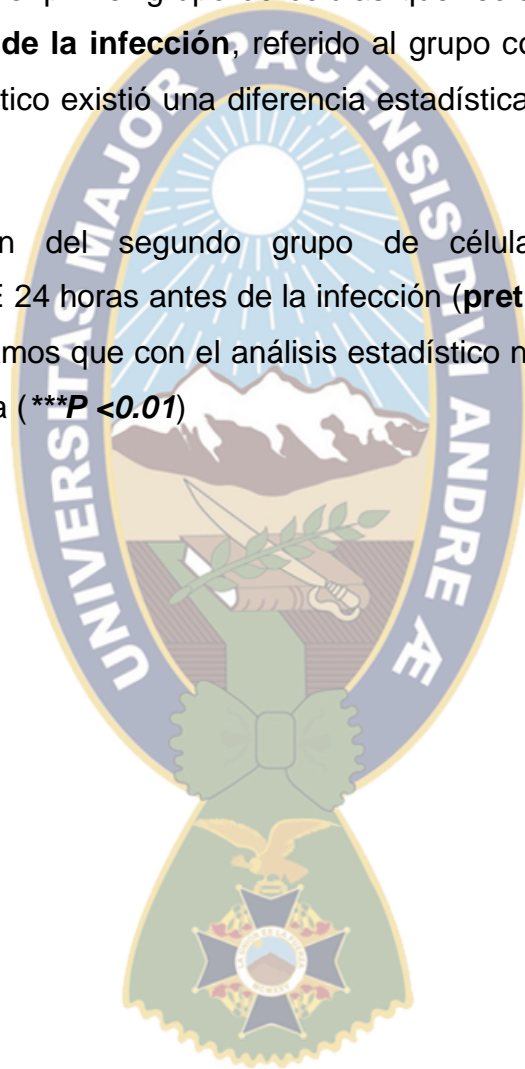


*En la evaluación de la capacidad microbicida de macrófagos, los grupos que recibieron la administración del extracto de alcaloides totales de Evanta EAE a diferentes tiempos se comportan de manera distinta. Se comparó la capacidad microbicida del grupo de macrófagos a los que se administró 50ug/mL de EAE al momento de la infección, así como el grupo de macrófagos que recibieron el pretratamiento versus el control de células que no recibieron tratamiento. (**P>0,01, ***P<0,01)*

Se comparó la influencia del momento de administración del extracto EAE, en los dos grupos de macrófagos referidos al control de células que no recibieron tratamiento, utilizando los conteos de células con parásitos intracitoplasmáticos a las 72 horas post infección (**Tabla N°7 Anexos**).

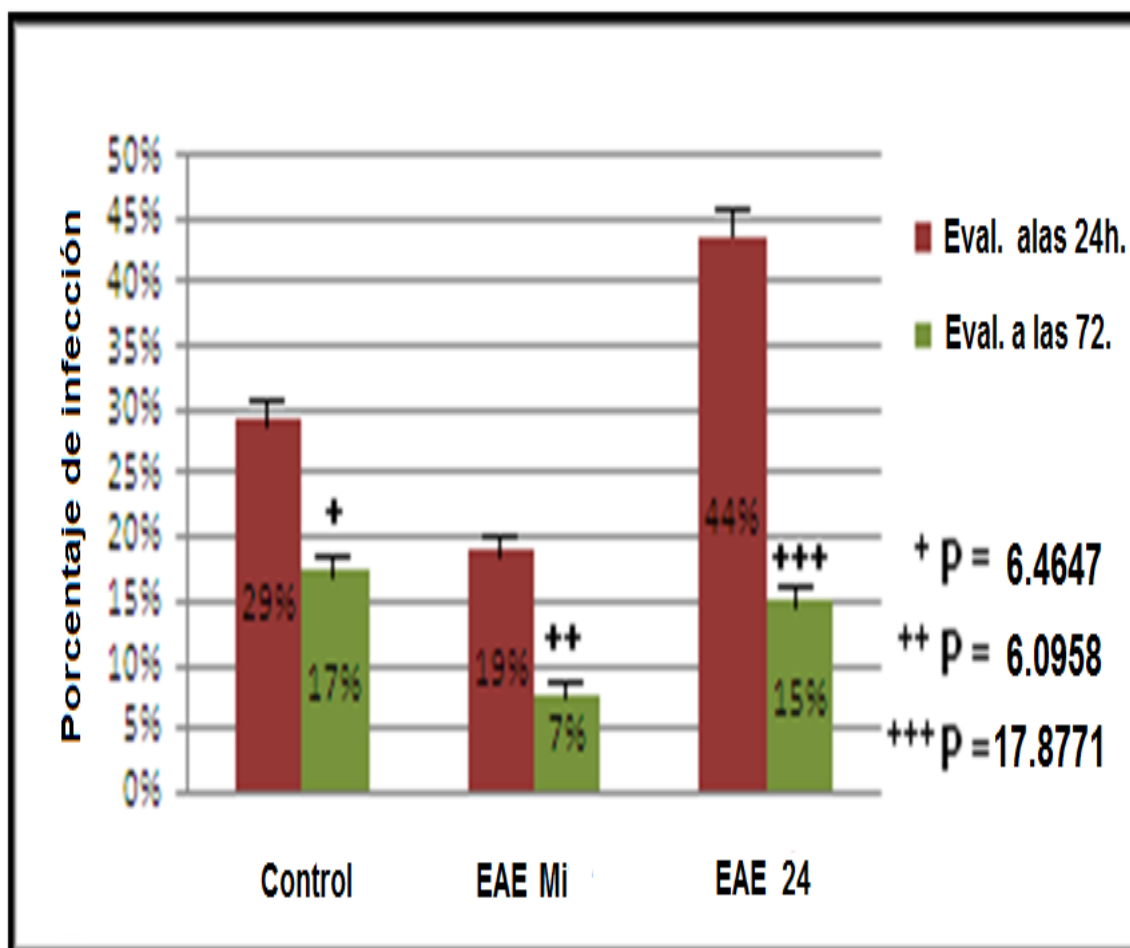
En la evaluación del primer grupo de células que recibieron la administración **de EAE al momento de la infección**, referido al grupo control, observamos que con el análisis estadístico existió una diferencia estadística altamente significativa (****P >0.01**)

En la evaluación del segundo grupo de células que recibieron la administración de EAE 24 horas antes de la infección (**pretratamiento**), referido al grupo control, observamos que con el análisis estadístico no existió una diferencia estadística significativa (*****P <0.01**)



8.7. Índices de fagocitosis

Figura N°23.- Análisis descriptivo de los índices de fagocitosis de los grupos de macrófagos en el tiempo



En el análisis de los índices de fagocitosis, la administración del extracto de alcaloides totales de Evanta EAE a diferentes tiempos promueve una mayor eficiencia. Se comparó la actividad fagocítica de las 24 horas con la de las 72 horas posteriores a la infección de los grupos de macrófagos a los que se administró 50ug/mL de EAE al momento de la infección, así como el grupo de macrófagos que recibieron el pretratamiento versus el control de células que no recibieron tratamiento. (+P>0,01, ++P>0,01, +++P>0,01)

Se hizo una comparación intragrupal, que nos permitió observar en el transcurso del tiempo el comportamiento de cada uno, para comprender mejor la influencia del **momento de administración** del extracto EAE **sobre la actividad fagocítica** en nuestro estudio.

Se compararon los valores obtenidos a las 24 y 72 horas post infección (**Tabla N° 8 Anexos**), de la actividad fagocítica de los macrófagos **control** infectados, apoyados en el análisis estadístico observamos que existió una diferencia estadística significativa (**+P>0.01**), y al contrastarlos se obtuvo un valor de 41.37% de actividad fagocítica.

Se compararon los valores obtenidos a las 24 y 72 horas post infección, del índice fagocítico de los macrófagos que recibieron EAE al momento de la infección, observándose con el análisis estadístico que existió una diferencia altamente significativa (**++P>0.01**) y al contrastarlos se obtuvo un valor de 63.15% de actividad fagocítica.

Se compararon los valores obtenidos a las 24 y 72 horas post infección, de la actividad fagocítica de los macrófagos control infectados, y con el análisis estadístico observamos que existió una diferencia altamente significativa (**+++P>0.01**) y al contrastarlos se obtuvo un valor de 65.9% de actividad fagocítica.

9.- Discusión.

Los factores que afectan la virulencia de *Leishmania* así como aquellos que modulan la respuesta inmune, representan un atractivo para nuestros estudios; En las investigaciones realizadas hasta la fecha, sobre las propiedades de EAE como agente antiparasitario, **(5),(7)** se evaluaron los efectos leishmanicidas de las quinolinas con grupos substituidos **(59-61)**, también se han hecho estudios sobre el efecto modulador de EAE en la proliferación celular **(8)**, así como en la producción de citoquinas en células murinas **(65)**, estudio que fue ampliado en cultivos *in vitro* de células humanas mononucleares de sangre periférica. **(66)**

De esta manera las investigaciones tomaron en cuenta también a las células en quienes se cumple el ciclo parasitario de *Leishmania* por excelencia, que son los macrófagos, estudiándose macrófagos murinos extraídos de médula ósea (Balb/c),**(68)** así como líneas celulares como J774A**(8)** y esplenocitos, evaluando tanto la activación celular, así como la producción de IFN γ .

Con la visión de complementar estas investigaciones, se emplearon cultivos de células humanas *In vitro*, **(66)**, que llevó al desarrollo de este trabajo, en el que se estudió el efecto de la administración de EAE tanto sobre la capacidad infectiva de los parásitos,**(68)** así como sobre la actividad fagocítica y microbicida de los macrófagos.

El aislamiento de las células mononucleares humanas por estratificación celular con Ficoll Hypaque, proporcionó una población celular viable, que se ajustó **(71)**, y se cultivó *in vitro* con el respectivo estímulo hormonal, contando al cabo 5 días con macrófagos maduros, listos para la experimentación.

La capacidad infectiva del grupo de macrófagos tratados con EAE al momento de la infección, evaluadas a las 24 horas post infección, presento un decremento **(19.23%)** en comparación al control, con una diferencia estadística, altamente significativa (****P >0.01**), posiblemente debido a que estas células contaron con los efectos del extracto de EAE en el momento en que éste actuaba como agente

antiparasitario, enmascarando la observación del verdadero actuar de los macrófagos bajo los efectos de EAE en el proceso de infección con *L. braziliensis*.

Esta disminución de la capacidad infectiva, que encubría una actividad leishmanicida propia de EAE, fue confirmada por el análisis del índice de infectividad; los resultados mostraron que EAE, tuvo un pobre efecto sobre el índice de infectividad, conservando el comportamiento de la variable predominante de un parásito por célula (**75.41%**), muy similar al control (**73,88%**), posteriormente por medio del análisis estadístico (*t* Student) se confirmó esta similitud, indicando que **no existió** una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$); por tanto la capacidad infectiva aparentemente no había sido modificada,

Luego de este análisis nació la duda, si el efecto de la administración de EAE al momento de la infección influyó concretamente sobre la capacidad infectiva de los parásitos o sobre la actividad fagocítica de los macrófagos o simplemente se trataba de la pura actividad leishmanicida del extracto; de esta manera se procedió con un **estudio paralelo** que modificaba el momento de la administración de los alcaloides, (**8**) permitiendo el actuar de estos sobre los macrófagos de manera previa, evitando la susceptibilidad de que nuestro análisis se enfocara en la actividad leishmanicida propia del extracto; manteniendo a las células cultivadas en contacto con los alcaloides 24 horas antes de la infección

En el estudio paralelo correspondiente al grupo de células que recibieron el pretratamiento, la capacidad infectiva evaluada a las 24 horas post infección, presenta un notable incremento (**43,79%**), con una diferencia altamente significativa ($***P > 0.01$) respecto al control, que sugiere que EAE posiblemente promovió una capacidad infectiva facilitada de los promastigotes, o una actividad fagocítica mejorada, afirmación que fue corroborada por el análisis del índice de infectividad de este grupo en estudio.

Los resultados del índice de infectividad reflejaron que la variable correspondiente a **1 parásito** por célula presentó un notable decremento hasta un

36,8%, comparado con el control (**73,88%**), una diferencia altamente significativa (****P>0.01**), a razón del incremento de la variable de **2-4 parásitos** por célula hasta un **46,36%** de capacidad infectiva comparado con el control (**17,29%**), p

Presentando una diferencia altamente significativa (*****P>0.01**), apoyado también por las **variable 5-7 parásitos y 8< parásitos** por célula, quienes reflejaron también diferencias estadísticas con el control, altamente significativas (**++P=>0.01** y **+++P= >0.01** respectivamente).

Este comportamiento totalmente distinto y sobresaliente que llamó la atención, fue el resultado de haber proporcionado un momento de interacción entre los macrófagos y los alcaloides de EAE, antes del proceso de infección, así se pudo reproducir con mayor exactitud, el efecto real del extracto de EAE sobre estas células y su real comportamiento frente a los promastigotes de *L. braziliensis*.

En los índices de fagocitosis, se observó que ambos grupos de macrófagos que recibieron el tratamiento con EAE, presentaron un comportamiento con diferencias estadísticas altamente significativas en las evaluaciones en el transcurso del tiempo, teniendo el primer grupo 7.41% de capacidad microbicida, una diferencia estadísticamente significativa como el segundo 15,12% (**++P=>0.01** y **+++P= >0.01**), con el aspecto sobresaliente que el control 17.83% que resultó también con una diferencia estadísticamente significativa (**P>0.01**).

La evaluación del índice de fagocitosis se aclaró al contrastar las frecuencias relativas en el tiempo observándose que ambos grupos de macrófagos, presentaron un comportamiento distinto al control, teniendo el primer grupo una **diferencia** de frecuencias relativas de 63,15% y el segundo un 65,9%, pero en este análisis el control resultó con la **diferencia** más baja (41,37%), lo cual nos sugiere que podría tratarse de una actividad fagocítica reducida e ineficaz; Además mencionar el hecho de que a las 72 horas posteriores a la infección, en el índice de infectividad del grupo de células control, la sub categoría de 8 o mas parásitos intracitoplasmáticos (8< parásitos) presentó un incremento atípico y

tardío, comportamiento que podría estar relacionado con la exacerbación del daño en el tejido y también con la cronicidad de la enfermedad.

Al observar las capacidades microbicidas de los dos grupos de macrófagos que recibieron el tratamiento con EAE, se evidencia que mostraron valores similares de actividad fagocítica, posiblemente debido a la sumatoria de actividades del extracto de alcaloides de EAE sobre la capacidad microbicida de los macrófagos así como el efecto leishmanicida intrínseco que posee. Hasta el momento nuestros resultados sugieren que se trata de una conducta que responde a una inmunomodulación **(8)**, **(66)**, **(68)** de la actividad fagocítica y que con el empleo de EAE ya sea de manera profiláctica o como alternativa de tratamiento de la Leishmaniasis, se podría hablar de un buen pronóstico en la resolución de esta patología.



10.- Conclusiones.

La evaluación del extracto de alcaloides totales de Evanta, sugiere que EAE posiblemente promovió una capacidad infectiva facilitada de los promastigotes, o una actividad fagocítica mejorada,

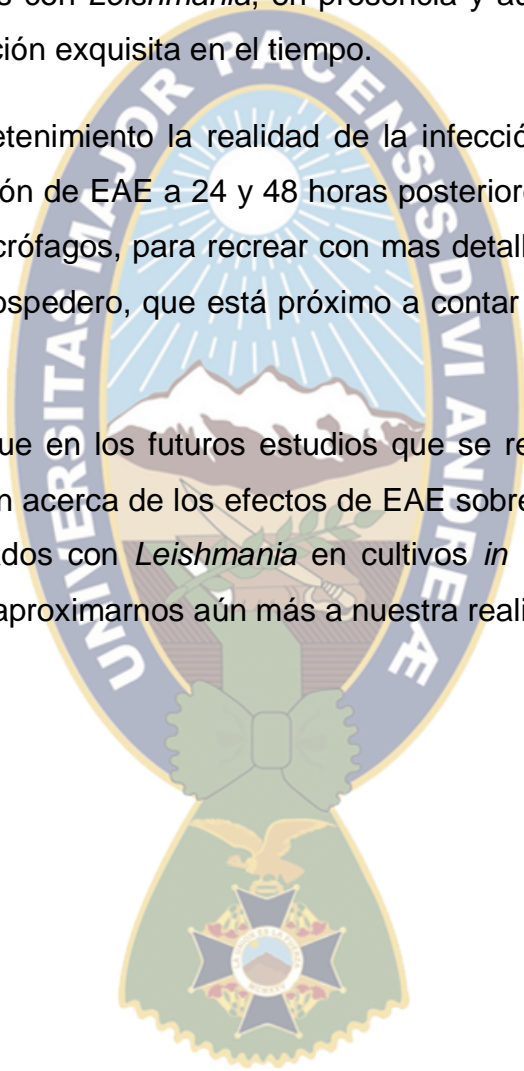
- Se estandarizó la técnica en la que el sistema *in vitro* planteado llegó a generar macrófagos maduros y viables a partir de células mononucleares de sangre periférica en 5 días.
- La administración de EAE 24 horas antes del proceso de infección promueve que el comportamiento de la capacidad infectiva de los promastigotes de *L. braziliensis* sobre los macrófagos humanos, sea distinto del control, lo que no sucede con el primer grupo (EAE Mi).
- La administración de EAE a diferentes tiempos incrementa la capacidad microbicida de macrófagos infectados con *L. braziliensis*.
- El momento de la administración de EAE presenta comportamientos distintos en la capacidad microbicida a favor de las células que recibieron el pretratamiento.
- El momento de la administración de EAE presenta mínimas diferencias en el índice de fagocitosis a favor de los dos grupos de estudio que recibieron el tratamiento.

11.- Recomendaciones.

Con la experiencia adquirida con este trabajo de investigación sugerimos realizar estudios con el desarrollo de un cultivo *in vitro*, que contemplen el análisis hasta las 120 horas posteriores a la infección, estudios que brindarían nuevas luces que nos permitirán conocer con más detalle el comportamiento de los macrófagos infectados con *Leishmania*, en presencia y ausencia del extracto de EAE, para una evaluación exquisita en el tiempo.

Analizando con detenimiento la realidad de la infección, sugerimos variar el tiempo de administración de EAE a 24 y 48 horas posteriores a la infección en los cultivos *in vitro* de macrófagos, para recrear con más detalle el proceso real de la Leishmaniasis en el hospedero, que está próximo a contar con el tratamiento con EAE.

Recomendamos que en los futuros estudios que se realicen en base a este trabajo de investigación acerca de los efectos de EAE sobre la actividad fagocítica de macrófagos infectados con *Leishmania* en cultivos *in vitro*, se utilicen cepas nativas, que permitan aproximarnos aún más a nuestra realidad



12 BIBLIOGRAFIA

- 1) Bogdan, C., Gessner A., Solbach. W., Rollinghoff, M. **Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites.** Current Opinions in Immunology. 1996;8: 517-525.
- 2) Agudelo, S., Robledo S., **Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp.** IATREIA. 2000; 13:167-178.
- 3) Stuart., K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R., cKerrow, J., Reed, S., and Tartelon, R. **Kinetoplastid: related protozoan pathogens, different diseases,** *J Clin Invest.* 2008.
- 4) Mittal, M.K., Rai, S., Ashutosh, Ravinder, Gupta, S., Sundar, S., and Goyal, N. **Characterization of natural antimony resistance in *leishmania donovani* isolates.** *Am J Trop Med Hyg.* 2007; **76**: 681-688.
- 5) Giménez A., Avila J.A., Ruiz G., Paz M., Udaeta E., Ticona JC, et al. **Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora* Krause.** *Rev Bol Quim.* 2005; 22(1): 94-107.
- 6) Gimenez, A., **UMSA-SIDA-SAREC program.** Work Report., La Paz, Bolivia. 2005.
- 7) Salamanca, E., Giménez, A., **Actividad antiparasitaria múltiple de Alcaloides Totales de Corteza de *Galipea longiflora* Krause Kallunki**
- 8) Calla-Magariños, Bioactive leishmanicidal alkaloid molecules from *Galipea longiflora* Krause with immunomodulatory activity. [tesis doctoral]. The Wenner-Gren Institute. Stockolm University. J. 2012;* in English: *dissertation.*
- 9) Calla-Magariños, J., Giménez, A., Troye-Blomberg, M., Fernández, C., **An Alkaloid Extract of Evanta, Traditionally Used as Anti-*leishmania* Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- γ Production in Polyclonally Activated Cells.** *Scandinavian Journal of Immunology.* doi: 10.1111/j.1365-3083.2008;02219.
- 10) Kone A, Delaunay P, Djimdé A, Thera M, Giudice P, Coulibaly D, Traoré K, Goita S, Abathina A, Izri A, Marty P, Doumbo O, ***Epidemiology of***

cutaneous Leishmaniasis in vive villages of Dogon country, Mali,
Buletí de la Societe de phatologie exotique.2012.

- 11) Campos, K., **Caracterización de las proteínas LABCG1 y LABCG5 de Leishmania: implicación en el tráfico intracelular de hemo y en la infección de macrófagos**, IPN Bio Med, Lopez-Neyra, Dep. Bioq Biomol, Universidad de Granada. GR 1719-2008.
- 12) Teixeira, S., and daRocha, W. **Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae**. *Genet Mol Res*.2003; **2**: 148-158.
- 13) Xu, C., Hines, J., Engel, M., Russell, D., and Ray, D. **Nucleus-encoded histoned histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the trypanosomatid Crithideafasciculatae**. *Mol Cell. Biol*. 1996; **16**:564-576.
- 14) Álvarez, F., Robello, C., Vignali, M. **Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans**. *MolBiolEvo*, 1994; **11**: 790-802.
- 15) Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M. **Molecular karyotype analysis in Leishmania**. *Subcell Biochem*. 1992; **18**: 131-187.
- 16) Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P., and Bastien, P. **The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species**. *Nucleic Acids Res*. 1996; **24**: 1688-1694.
- 17) Ouellette, M. **Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites**. *Trop Med Int Health*. 2001.
- 18) Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., Olivier, M., Ouellette, M. **Gene disruption of the P-glycoprotein related gene Pgpa of Leishmania tarentolae**. *BiochemBiophys Res Commun*. 1996; **224**: 772-778.
- 19) Campbell, D.A., Thomas, S., and Sturm, N.R. **Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?** *Microbes Infect*. 2003; **5**: 1231-1240.

- 20) McConville, M.J., de Souza, D., Saunders, E., Likic, V.A., and Naderer, T. **Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes.** *Trends Parasitol.* 2007; **23**: 368-375.
- 21) Pal, J.K., and Joshi-Purandare, M. **Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro.** *J Biosci.* 2001; **26**: 225-231.
- 22) Rao, A.U., Carta, L.K., Lesuisse, E., and Hamza, I. **Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**: 4270-4275.
- 23) Krishnamurthy, G., Vikram, R., Singh, S.B., Patel, N., Agarwal, S., Mukhopadhyay, G., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. **Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket.** *J Biol Chem.* 2005; **280**: 5884-5891.
- 24) Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., et al. **Identification of an intestinal heme transporter.** *Cell.* 2005; **122**: 789-801.
- 25) Chang, C.S., and Chang, K.P. **Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*.** *Mol Biochem Parasitol.* 1995; **16**: 267-276.
- 26) Ilgoutz, S.C., and McConville, M.J. **Function and assembly of the *Leishmania* surface coat.** *Int J Parasitol.* 2001; **31**: 899-908.
- 27) Yao, C., Donelson, J.E., Wilson, M.E. **The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function.** *Mol Biochem Parasitol.* 2003; **132**: 1-16.
- 28) McConville, M.J., and Homans, S.W. **Identification of the defect in lipophosphoglycan biosynthesis in a non-pathogenic strain of *Leishmania major*.** *J Biol Chem.* 1992; **267**: 5855-5861.
- 29) Lodge, R., and Descoteaux, A. **Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*.** *Clin Immunol.* 2005; **114**: 256-265.

- 30) Haile,S., and Papadopoulou ,B. **Developmental regulation of gene exspression in trypanosomatid parasitic protozoa.** *CurrOpinMicrobiol* .2007; 10:569-557.
- 31) Muskus,C.,Villa,M. **Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de Leihmania.**,*Biomédica,INSC,Colombia,6,2002; 22:167-177*
- 32) Kamhawi, S. **Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?** *Trends Parasitol.*2006; **22:** 439-445.
- 33) Schaible, U.E., Schlesinger, P.H., Steinberg, T.H., Mangel, W.F., Kobayashi, T.,Russell, D.G. **Parasitophorous vacuoles of Leishmania mexicana acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes.** *J Cell Sci* .1999; **112 (Pt 5):** 681-693.
- 34) vanZandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., et all. **Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103:** 13837-13842.
- 35) Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and Moreno, S.N. **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man.** *Nat Rev Microbiol.* donovani. *Indian J Med Re.* 2005; **3:** 251- 261.
- 36) Sunderkotter, C., Kunz, M., Steinbrink, K., Meinardus-Hager, G., Goebeler, M., Bildau, H., and Sorg, C. **Resistance of mice to experimental Leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo.** *J Immunol* 1993; **151:** 4891-4901
- 37) Guermonprez P, Amigorena S. **Pathways for antigen cross presentation.** *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26:257-271.
- 38) Lafuente,R., Florensa,L. Hematología Clínica Sans-Sabrafen. **Hematopoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis. Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos.** Barcelona: Ed. DOYMA;2006
- 39) Natarajan,U., Randhawa,N.,Brummer,E. **Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on candidacidal activity of neutrophils, monocytes or monocyte-derived macrophages and**

synergy with fluconazole. J. Med.Micro-mycology.The phatological Society of Great Britain and Ireland.1998.

- 40) Delneste, Y., Charbonnier, P., Herbault,N. **Interferon-g switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages.** A.S.of Hematology. 2003.
- 41) Kemp M, Hansen MB, Theander TG. **Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from non-exposed individuals.** Infect Immun. 1992; 60:246-251.
- 42) Sacks D, Noben-Trauth N. **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.** Nat Rev Immunol 2002; 2:845-858.
- 43) Hernández, R.,Becker,I. **Linfocitos T citotóxicos CD8+ en leishmaniasis cutánea.** Salud Pública Mex. 2006; 48:430-439.
- 44) Henriques, C., da Souza, W. **Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole.** Parasitol Res.2000; 86: 215-225
- 45) Alexander, J., Satoskar, A.R.,Russell, D. ***Leishmania* species: models of intracellular parasitism.** J Cell Sci 112 Pt .1999; 18: 2993-3002.
- 46) Tripathi, A., Gupta, C.M. **Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes.** Mol Biochem Parasitol.2003; 128: 1-9.
- 47) Moreira, M.E., de Freitas Balanco, J.M., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G. et all. **Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity.** Curr Biol .2001; 11: 1870-1873.
- 48) Wu, Y., Tibrewal, N., and Birge, R. **Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill.** Trends Cell Biol .2006; 16: 189-197.
- 49) Wanderley, J.L., Moreira, M.E., Benjamin, A., Bonomo, A.C., and Barcinski, M.A. **Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts.** J Immunol .2006;176: 1834-1839.

- 50) Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. **A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.** *Nature.* 2000; **405**: 85-90.
- 51) Cox F, Liew FY. **T-cell subsets and cytokines in parasitic infections.** *Immunol Today* 1992; **13**:445-448.
- 52) Rossi-Bergmann B, Müller I, Godinho EB. **Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cell in murine leishmaniasis.** *Infect Immun.*1993; **61**:266-269.
- 53) Scott P. **IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis.** *J. Immunol* 1991; **147**:149-155.
- 54) Mocci,S., and Coffman. R. **Induction of a Th2 population from a polarized Leishmania-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4 .** DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology Incorporated, Palo Alto, CA 94304, USA. *The Journal of Immunology*, Vol 154, Issue 8 3779-3787, Copyright © 1995 by American Association of Immunologists.
- 55) Bertho A, Santiago M, Da-Cruz A, Coutinho SG. **Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis.** *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**:317-325.
- 56) Wanderley, J., Benjamin, A., Real, F., Bonomo, A., Moreira, M., Barcinski, M.A. **Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay.** *Braz J Med Biol Res.*2005; **38**: 807-812.
- 57) Silva,V., Larangeira,D., Oliveira,P., Sampaio,R., Suzart,P. Biointervention. Student Group. **Enhancement of Experimental Cutaneous Leishmaniasis by Leishmania Molecules Is Dependent on Interleukin-4, Serine Protease/Esterase Activity, and Parasite and Host Genetic Backgrounds,** *J. ASM.Org. Infect. Immun.* 2011 **vol. 79 no. 3** 1236-1243.
- 58) Fournet A, Vagneur B, Richomme P, Bruneton J. **Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d' une Rutacée bolivienne: Galipea longiflora.** *Can J Chem.* 1989; **67**: 2116-2118.

- 59) Fournet A, Angelo A, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A, Bruneton J. **2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potencial Antileishmanial Drugs.** 1993; **37** (4): 859-863.
- 60) Fournet,A., Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Muñoz MH, Mayrargue J, Moskowitz H, Cavé A, Hocquemiller R. **The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania Donovan*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; **33**: 537-544.
- 61) Fournet A, Ferreira ME, Rojas A, Torres S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. **In Vivo Efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines in Experimental Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**(11): 2447-2451.
- 62) Rios,Y., Otero,A., Muñoz,D., et all. **Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*)** .Rev. Colomb. Cienc.Quím. Farm.2008; **37** (2):200-211.
- 63) Polonió, T., Eferth,T. **Leishmaniasis: Drug resistance and natural products.** Rev. Int.J. Mol. Med.2008; **69**:251-258.
- 64) Paz, M., **Evaluacion citotóxica/citostática, antibacteriana, antifungica y cultivo in vitro de *Galipea longiflora* Krause.** Tesina, Fac Cien Farm Bioq-UMSA Bioquímica, La Paz,Bolivia.1998.
- 65) Calla,,J., Troye-Blomberg, M., Fernandez,C., ***El extracto de alcaloides de Galipea longiflora (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro – inflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral e Interferon- y in vitro.*** BIOFARBO. 2006.
- 66) Montes, F. **Evaluación de la respuesta proliferativa y de producción de citoquinas de Linfocitos provenientes de pacientes con Leishmaniasis cutánea, tratados con extracto de Evanta.** [Tesis de licenciatura]. Fac Cien Farm Bioq-UMSA, Bioquímica – I. SELADIS.2010.
- 67) Limache-Valderrama,S. **Detección de la expresión del gen interferon gamma mediante RT-PCR en células murinas tratadas con *Galipea longiflora (Evanta)*.**[Tesis de licenciatura], Fac Cien Farm Bioq-UMSA, Bioquímica – I. SELADIS.2010.

- 68) Quispe,E. **Efecto del extracto de Alcaloides totales de Evanta sobre macrófagos murinos infectados con Leishmania braziliensis In vitro.** [Tesis de especialidad], Fac Cien Farm Bioq-UMSA, Bioquímica – I. SELADIS.2012.
- 69) Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. **Epidemiological, clinical and pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India.** Indian J Med Res.2004; **120:166-172.**
- 70) Rijal S, Chappuis F, Singh R, Bovier PA, Acharya P, Karki BM, et all. **Treatment of visceral Leishmaniasis in south-eastern Nepal: decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline.** Trans R Soc Trop Med Hyg.2003; **97:350-354.**
- 71) Costa J, Garcia A, Rêbello J, Guimarães K, Guimarães R, Nunes P. **Óbito durante tratamento da leishmaniose tegumentar americana com stibogluconato de sódio bp 88® (shandong xinhua).** Rev Soc Bras Med Trop.2003; **36:295-298.**
- 72) Rijal S, Chappuis F, Singh R, Boelaert M, Loutan L, Koirala S. **Sodium stibogluconate cardiotoxicity and safety of generics.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; **97:597-598.**
- 73) Bosque, F., Milon,G., Valderrama,L. **Permissiveness of human monocytes and monocyte4-derived macrophages to infection by promastigotes of Leishmania (Viannia) panamensis.** *A.S. of parasitol.* 1998.
- 74) Arce,A.,Linares,M.,Vilaescusa,R., **Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos.** Rev Cuvana, *Inmunología y Hemoterápia.*2001.

13. ANEXOS

Anexo N° 1

Tabla N°4 Análisis del índice de infectividad de macrófagos que recibieron EAE al momento de la infección

Categoría	Índice de infectividad		Índice de infectividad		Índice de infectividad		Índice de infectividad	
Sub categoría	1 Parásito%		2-4 Parásitos %		5-7 Parásitos %		8< Parásitos %	
Análisis paramétrico	Prueba t		Prueba t		Prueba t		Prueba t	
Intervalo de confianza	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$	
Nivel de confianza	2.3739		2.3739		2.3739		2.3739	
Grados de libertad	80		80		80		80	
N° de Colas	1 Cola		1 Cola		1 Cola		1 Cola	
Parámetro	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi
Media	73.88	75.41	17.29	19.55	7.29	4.33	1.52	0.69
Desviación Estándar	13.7	6.68	8.3	6.49	5.12	3.28	1.23	0.99
N° de datos	30	30	30	30	30	30	30	30
Valor de t	P = 0.546		P = 1.179		P = 2.6723		P = 2.8671	
Nivel de significancia	Ho	H1	Ho	H1	Ho	H1	Ho	H1
	Se acepta	Se rechaza	Se acepta	Se rechaza	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta

El valor de P se estableció en la prueba t de Student con una confiabilidad del 99%.

** Se resaltan las sub categorías en que los valores de t muestran una situación anormal, con un resultado experimental que discrepa más de lo tolerado, por tanto se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis de investigación (H1).*

Frecuencia relativa del número de parásitos intracitoplasmáticos por célula contados, de acuerdo a intervalos que obedecen a sub categorías

Tabla N°5 Análisis del índice de infectividad de macrófagos que recibieron EAE 24 horas antes de la infección

Categoría	Índice de infectividad		Índice de infectividad		Índice de infectividad		Índice de infectividad	
Sub categoría	1 Parásito%		2-4 Parásitos %		5-7 Parásitos %		8< Parásitos %	
Análisis paramétrico	Prueba t		Prueba t		Prueba t		Prueba t	
Intervalo de confianza	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$	
Nivel de confianza	2.3739		2.3739		2.3739		2.3739	
Grados de libertad	80		80		80		80	
N° de Colas	1 Cola		1 Cola		1 Cola		1 Cola	
Parámetro	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi
Media	73.88	36.80	17.29	46.36	7.29	11.32	1.52	5.52
Desviación Estándar	13.7	1.28	8.3	2.45	5.12	2.18	1.23	1.26
N° de datos	30	30	30	30	30	30	30	30
Valor de t	P = 14.7641		P = 18.3913		P = 3.9521		P = 12.4113	
Nivel de significancia	Ho	H1	Ho	H1	Ho	H1	Ho	H1
	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta

El valor de P se estableció en la prueba t de Student con una confiabilidad del 99%.

** Se resaltan las sub categorías en que los valores de t muestran una situación anormal, con un resultado experimental que discrepa más de lo tolerado, por tanto se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis de investigación (H1).*

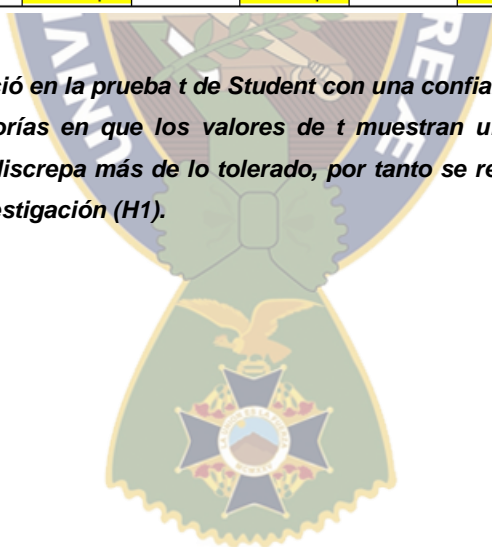


Tabla N°6 Análisis de la capacidad infectiva a diferentes tiempos de administración de EAE

Categoría	Capacidad infectiva		Capacidad infectiva	
Análisis paramétrico	Prueba t		Prueba t	
Intervalo de confianza	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$	
Nivel de confianza	2.3739		2.3739	
Grados de libertad	80		80	
N° de Colas	1 Cola		1 Cola	
Parámetro	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi
Media	29.44	19.23	29.44	43.79
Desviación Estándar	6.68	10.57	6.68	8.18
N° de datos	30	30	30	30
Valor de t	P = 4.4723		P = 7.4388	
Nivel de significancia	Ho	H1	Ho	H1
	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta

El valor de P se estableció en la prueba t de Student con una confiabilidad del 99%.

** Se resaltan las sub categorías en que los valores de t muestran una situación anormal, con un resultado experimental que discrepa más de lo tolerado, por tanto se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis de investigación (H1).*

Expresión porcentual del cociente del número de células infectadas y el total de células vistas, al microscopio, evaluada a las 24 horas post infección, que refleja la suficiencia de los parásitos para infectar a macrófagos.

Tabla N° 7 Análisis de la capacidad microbicida a diferentes tiempos de administración de EA

Categoría	Capacidad infectiva		Capacidad infectiva	
Análisis paramétrico	Prueba t		Prueba t	
Intervalo de confianza	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$	
Nivel de confianza	2.3739		2.3739	
Grados de libertad	80		80	
N° de Colas	1 Cola		1 Cola	
Parámetro	Control	EAE Mi	Control	EAE Mi
Media	17.83	7.41	17.83	15.12
Desviación estándar	7.2	0.78	7.2	3.17
N° de datos	30	30	30	30
Valor de t	P = 7.8701		P = 1.8783	
Nivel de significancia	Ho	H1	Ho	H1
	Se rechaza	*Se acepta	Se acepta	Se rechaza

El valor de P se estableció en la prueba t de Student con una confiabilidad del 99%.

** Se resaltan las sub categorías en que los valores de t muestran una situación anormal, con un resultado experimental que discrepa más de lo tolerado, por tanto se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis de investigación (H1).*

Expresión porcentual del cociente entre el número de células infectadas y el total de células vistas, al microscopio, evaluada a las 72 horas post infección con promastigotes de *L.braziliensis*, que refleja el talento de los macrófagos para eliminar los parásitos intracitoplasmáticos que presentaron.

Tabla N° 8 Análisis de los índices de fagocitosis de los grupos de macrófagos en el tiempo

Categoría	Índice de fagocitosis		Índice de fagocitosis		Índice de fagocitosis	
Sub categoría	Control		EAE Mi		EAE 24	
Análisis paramétrico	Prueba t		Prueba t		Prueba t	
Intervalo de confianza	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.01$	
Nivel de confianza	2.3739		2.3739		2.3739	
Grados de libertad	80		80		80	
N° de Colas	1 Cola		1 Cola		1 Cola	
Parámetro	Control 24	Control 72	EAE Mi 24	EAE Mi 72	EAE 24 - 24	EAE 24 - 72
Media	29.43	17.83	19.22	7.41	43.79	15.12
Desviación estándar	6.68	7.2	10.57	0.78	8.18	3.17
N° de datos	30	30	30	30	30	30
Valor de t	P = 6.4647		P = 6.0958		P = 17.8771	
Nivel de significancia	Ho	H1	Ho	H1	Ho	H1
	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta	Se rechaza	*Se acepta

El valor de P se estableció en la prueba t de Student con una confiabilidad del 99%.

** Se resaltan las sub categorías en que los valores de t muestran una situación anormal, con un resultado experimental que discrepa más de lo tolerado, por tanto se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis de investigación (H1).*

Es la evolución de las expresiones porcentuales de capacidad infectiva en el tiempo hasta la capacidad microbicida, brindando una idea del comportamiento fagocítico de los macrófagos

Tabla N°9 Componentes del medio M199 para amastigotes axénicos

Medio 199	2.75g
TCS 0.5%	1.25g
Glucosa	0.67g
NaHCO ₃	87.5g
Hepes	1.48mL
L.Glutamina	2.5mL
Hemina (*)	0.7mL
Penicilina – Estreptomycin	3.25mL

(*) Hemina en Na(OH) 1N (5mg/mL), la cual es añadida sobre la solución antes preparada.

Se cultivaron promastigotes de *L. braziliensis*, en medio líquido M199 y hemina en medio alcalino pH 6,8, y llevados a temperatura de 32°C durante 5 días. **(68)**

Tabla N° 10 Rendimientos y actividad leishmanicida *in vitro* de alcaloides quinolínicos de *Galipea longiflora*. (7)

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

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

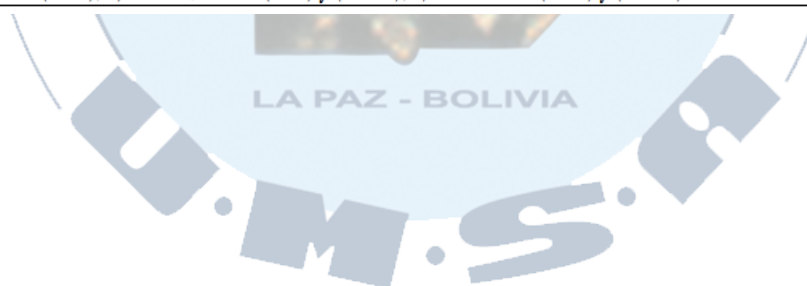
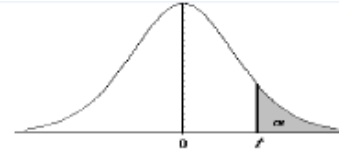


Tabla N° 11 Distribución T Student

Contiene los valores t tales que $p[T > t] = \alpha$,
 donde n son los grados de libertad



$n \setminus \alpha$	0,30	0,25	0,20	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	0,7265	1,0000	1,3764	3,0777	6,3137	12,7062	31,8210	63,6559	127,3213	318,3088	636,6192
2	0,6172	0,8165	1,0607	1,8856	2,9200	4,3027	6,9645	9,9250	14,0890	22,3271	31,5991
3	0,5944	0,7849	0,9785	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	7,4533	10,2145	12,9240
4	0,5886	0,7407	0,9410	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,6041	5,5976	7,1732	8,6103
5	0,5594	0,7287	0,9195	1,4759	2,0150	2,5708	3,3849	4,0321	4,7733	5,8934	6,8688
6	0,5534	0,7176	0,9057	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	4,3168	5,2076	5,9598
7	0,5491	0,7111	0,8980	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	4,0293	4,7853	5,4079
8	0,5459	0,7064	0,8889	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	3,8325	4,5008	5,0413
9	0,5435	0,7027	0,8834	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	3,6867	4,2968	4,7809
10	0,5415	0,6998	0,8791	1,3722	1,8125	2,2281	2,7838	3,1693	3,5814	4,1437	4,5869
11	0,5399	0,6974	0,8755	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	3,4966	4,0247	4,4370
12	0,5386	0,6955	0,8726	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	3,4284	3,9296	4,3178
13	0,5375	0,6938	0,8702	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	3,3725	3,8520	4,2208
14	0,5366	0,6924	0,8681	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	3,3257	3,7874	4,1405
15	0,5357	0,6912	0,8662	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	3,2860	3,7328	4,0728
16	0,5350	0,6901	0,8647	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	3,2520	3,6862	4,0150
17	0,5344	0,6892	0,8633	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,2224	3,6458	3,9651
18	0,5338	0,6884	0,8620	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,1966	3,6105	3,9216
19	0,5333	0,6876	0,8610	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,1737	3,5794	3,8834
20	0,5329	0,6870	0,8600	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,1534	3,5518	3,8495
21	0,5325	0,6864	0,8591	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,1352	3,5272	3,8193
22	0,5321	0,6858	0,8583	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,1188	3,5050	3,7921
23	0,5317	0,6853	0,8575	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,1040	3,4850	3,7676
24	0,5314	0,6848	0,8569	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7970	3,0905	3,4668	3,7454
25	0,5312	0,6844	0,8562	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,0782	3,4502	3,7251
26	0,5309	0,6840	0,8557	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,0669	3,4350	3,7066
27	0,5306	0,6837	0,8551	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,0565	3,4210	3,6896
28	0,5304	0,6834	0,8546	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,0469	3,4082	3,6739
29	0,5302	0,6830	0,8542	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,0380	3,3962	3,6594
30	0,5300	0,6828	0,8538	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,0298	3,3852	3,6460
40	0,5286	0,6807	0,8507	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	2,9712	3,3069	3,5510
80	0,5265	0,6776	0,8461	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	2,8870	3,1953	3,4163
120	0,5258	0,6765	0,8448	1,2866	1,6576	1,9799	2,3578	2,6174	2,8599	3,1595	3,3735
∞	0,5244	0,6745	0,8416	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	2,8070	3,0902	3,2905

Tomado de <http://www.upcomillas.es/personal/peter/investigacion/Tama%FIoMuestra.pdf>

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo....., de años de edad y con C.I....., expedido en, manifiesto que he sido informado sobre los objetivos del Proyecto de Investigación “*ENFERMEDADES INFECCIOSAS NUEVAS TERAPIAS ALTERNATIVAS: EVANTA EN EL TRATAMIENTO DE LEISHMANIASIS CUTANEA*” que tiene como fin encontrar un tratamiento alternativo para la leishmaniasis cutanea. He sido informado sobre los riesgos y beneficios que podría suponer el uso de una pomada a base de EVANTA como tratamiento. Que el tratamiento incluye la extracción de un volumen total de 75mL de sangre venosa, durante los 15 meses que estaré involucrado en este proyecto, y que las tomas de muestras serán de acuerdo a tiempos establecidos.

He sido informado de los posibles perjuicios que el tratamiento y la extracción de muestras de sangre a diferentes tiempos, puedan tener sobre mi bienestar y salud, así mismo se me harán conocer los resultados de las pruebas realizadas con mis muestras sanguíneas y sobre el seguimiento clínico de mi enfermedad.

He sido también informado de que mis datos personales serán manejados confidencialmente y protegidos según las normas vigentes de Bioética. Que mi participación en el proyecto es **VOLUNTARIA** y que en cualquier momento, puedo retirar mi consentimiento a seguir participando del mismo, sin que mi tratamiento médico posterior se vea afectado.

Por lo tanto, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a participar en este proyecto.

Palos Blancos,..... dedel 2007.

Firma: **Firma:**

PACIENTE:..... Medico Resp.....
CI:..... CI.....

Firma Testigo:

Confirmando que he escuchado la explicación oral del estudio, de los riesgos y beneficios así como la información de los tratamientos alternativos, seguros, compensaciones y confidencialidad de los datos por un medico responsable del estudio. No soy compañero de trabajo, ni dependo de ningún modo del investigador principal o de la unidad de salud donde se realiza el estudio. Confirmando que el paciente acepto voluntariamente participar de este estudio

Firma:

Testigo.....
CI.....

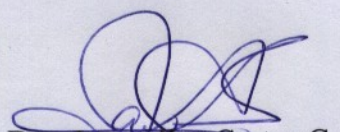
CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO

A quien corresponda:

La Comisión de Ética de la Investigación (CEI) del Comité Nacional de Bioética, tiene a bien informar que fue presentado a la CEI, para su revisión y aval ético el proyecto titulado: **“Enfermedades Infecciosas, Nuevas Terapias: Evanta en el Tratamiento de Leishmaniasis Cutánea”**, por la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas –UMSA, Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), Centro de Información y Documentación del Medicamento (CIDME), Departamento de Inmunología – Universidad de Estocolmo – Suecia, Hospital de Palos Blancos y el Proyecto OSCAR – Obras Sociales Caminos de Acceso Rural-Palos Blancos. Cuyos Investigadores Responsables de la Valoración Clínica son: Dra. Susy Machicado, Dr. Walter Magariños, Dr. Fernando Sosa, Dr. Alberto Giménez y el Dr. Orlando Choque. Dicho proyecto fue evaluado en dos oportunidades, bajo los criterios éticos que se toman en cuenta para todo proyecto de investigación que involucra seres humanos:

1. Validez científica (que el proyecto cumpla con los requisitos de la metodología científica).
2. Selección equitativa de la muestra (tomando en cuenta principalmente el manejo de grupos vulnerables).
3. Validez social (pertinencia, atingencia y relevancia del proyecto).
4. Relación Riesgo/Beneficio (viendo que el riesgo(s) sea mínimo(s) y mayor el beneficio(s) para los sujetos de estudio).
5. El Consentimiento Informado (documento que refleje el respeto a la autonomía del participante en el estudio, redactado de una manera clara, comprensible y lo suficientemente informativo para el sujeto de investigación).

Una vez verificadas las correcciones hechas por el equipo investigador, en base a las observaciones de la CEI, es que se tiene a bien certificar que el mencionado proyecto cumple con todos los requisitos éticos arriba mencionados, por lo que los miembros del CEI dan el respectivo **AVAL ÉTICO** al proyecto **“Enfermedades Infecciosas, Nuevas Terapias: Evanta en el Tratamiento de Leishmaniasis Cutánea”**, el mismo que puede proseguir con su ejecución.



Dra. Jacqueline Cortez G.
COORDINADORA

La Paz, 21 de diciembre de 2006

