



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**EFFECTO ANTILEISHMANIAL DEL TRATAMIENTO PREVENTIVO CON
RETINOIDES EN RATONES BALB/c//BIO INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE**

www.bdigital.ula.ve

Autor: Br. Diliaana D Jaimes Alarcón

Tutor(a): Dra. Loredana Goncalves Paredes

Mérida, 01 Diciembre de 2022



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**EFFECTO ANTILEISHMANIAL DEL TRATAMIENTO PREVENTIVO CON
RETINOIDES EN RATONES BALB/c//BIO INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE**

Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis

Autor: Br. Dilia D Jaimes Alarcón

Tutor(a): Dra. Loredana Goncalves Paredes

Mérida, 01 Diciembre de 2022

DEDICATORIA

A Dios

Quien como guía ha estado presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con uno de los anhelos más deseados sin desfallecer.

A mis padres:

German Jaimes quien me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por sí mismo.

Omaira Alarcón, quien me enseñó que incluso la tarea más grande se puede lograr si se hace un paso a la vez.

www.bdigital.ula.ve

Gracias por su apoyo incondicional, dedicación y sacrificio incansable por darme el regalo máspreciado, el estudio, a Uds. mi logro es suyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Los Andes y la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por brindarme la oportunidad de prepararme profesionalmente, orgullosa de pertenecer a tan prestigiosa casa de estudios.

Así mismo, quiero agradecer profundamente a mi tutora Prof. Loredana Goncalves Paredes junto a su equipo de trabajo en el Laboratorio de Inmunología y Parasitología (LABINPAR) en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes por brindarme las herramientas para llegar hasta el final de esta meta, por todos los conocimientos impartidos, consejos, dedicación y orientación.

A mi familia, especialmente a mis hermanos Hernando J Leal A, Elendy X Leal A, Pedro A Leal A y Jesús D Jaimes A, por sus consejos, lealtad y cariño.

A mis compañeros gracias por el apoyo y motivación durante estos años, por compartir conmigo alegrías y tristezas, por ser parte de esta familia universitaria que me aportó y brindó más que una bonita amistad.

Por último, gracias a mis amigos que me han acompañado a lo largo de la vida Aura K Espinoza P y Heidher H Braca F por motivarme a seguir adelante, y demostrarme que para alcanzar los sueños se debe trabajar fuertemente.

¡Muchas gracias!

Apéndice

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE ESQUEMA	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	2
Planteamiento del Problema	2
Justificación de la Investigación	3
Objetivos de la Investigación	4
<i>Objetivo General</i>	4
<i>Objetivos Específicos</i>	4
Alcances y Limitaciones de la Investigación	4
<i>Alcances de la Investigación</i>	4
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
Trabajos Previos	6
Antecedentes Históricos	9
Antecedentes Teóricos	11
<i>Características Histológicas de la piel</i>	11
<i>Epidermis</i>	11
<i>Capa córnea</i>	12
<i>Estrato Lúcido</i>	12
<i>Estrato granuloso</i>	12
<i>Estrato espinoso, escamoso o Malpighiano</i>	13
<i>Capa basal, germinal o germinativa</i>	13
<i>Dermis</i>	15
<i>Hipodermis</i>	17

<i>Cambios Histopatológicos asociados al tejido cutáneo</i>	17
<i>Hiperqueratosis</i>	17
<i>Ortoqueratosis</i>	18
<i>Paraqueratosis</i>	18
<i>Hiperplasia epidérmica endofítica</i>	18
<i>Acantosis</i>	19
<i>Hipoplasia</i>	19
<i>Atrofia</i>	19
<i>Infiltrado Celular</i>	20
<i>Granuloma</i>	20
<i>Fibrosis</i>	20
<i>Necrosis Tisular</i>	21
<i>Vasculitis</i>	21
<i>Leishmania</i>	22
<i>Ciclo Biológico</i>	24
<i>Leishmaniasis</i>	25
<i>Leishmaniasis Cutánea</i>	25
<i>Tratamiento</i>	27
<i>Respuesta Inmunitaria Anti-Leishmania</i>	28
<i>Respuesta innata</i>	28
<i>Respuesta antígeno específica</i>	29
<i>Modelo Experimental</i>	31
<i>Retinoides</i>	32
<i>Metabolismo de los retinoides</i>	33
Hipótesis	34
Operacionalización de las variables	34
<i>Variables Dependientes</i>	34
<i>Variables Independientes</i>	34
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	37
Tipo de Investigación	37

Diseño de la Investigación	37
Población y Muestra	38
<i>Unidad de investigación</i>	39
<i>Selección del tamaño muestral</i>	40
Instrumento de Recolección de Datos	40
Procedimiento o Metodología de la Investigación	40
<i>Modelos de inducción</i>	40
<i>Preparación de los fármacos a administrar</i>	41
<i>Aislamiento de amastigotes y obtención de los promastigotes de</i>	41
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana para los ensayos de evaluación del</i>	
<i>efecto anti-leishmanial</i>	
<i>Infección experimental de los modelos muridos con promastigotes</i>	42
<i>de Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	
<i>Obtención de la lesión y preparación de los tejidos para histología.</i>	43
<i>Detección de antígenos de Leishmania (Leishmania) mexicana y</i>	43
<i>estudio histopatológico de los tejidos de piel.</i>	
Diseño de Análisis	44
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Resultados	46
<i>Eficacia Terapéutica de β-caroteno, Vitamina A e Isotretinoína en</i>	46
<i>la clínica de Leishmaniasis cutánea</i>	
<i>Cambios Histopatológicos cutáneos</i>	46
<i>Controles sanos</i>	47
<i>Controles Infectados</i>	47
<i>Tratamiento preventivo con β-caroteno</i>	47
<i>Tratamiento preventivo con Vitamina A</i>	48
<i>Tratamiento preventivo con Isotretinoína</i>	48

<i>Presencia de amastigotes y de antígenos de Leishmania</i>	48
<i>(Leishmania) mexicana en lesiones cutáneas de ratones tratados con retinoides</i>	
<i>Ratones sanos</i>	48
<i>Ratones Infectados</i>	48
<i>Tratamiento preventivo</i>	49
Discusión	54
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
Conclusiones	63
Recomendaciones	63
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	64

www.bdigital.ula.ve

Índice De Tablas

	Pág.
Tabla I. Taxonomía de <i>Leishmania</i>	22
Tabla II. Clasificación del género <i>Leishmania</i>	24
Tabla III. Operacionalización de la variable dependiente	35
Tabla IV. Operacionalización de las variables independientes	36
Tabla V. Población y Muestra	39

Índice De Esquema

	Pág.
Esquema I Taxonomía de <i>Leishmania</i>	45

www.bdigital.ula.ve

Índice de Figuras

		Pág
Figura I.	Capas de la piel	15
Figura II.	Histopatología de la piel de ratones sanos, infectados y sanos tratados con isotretinoína	50
Figura III.	Histopatología de tejidos cutáneos provenientes de ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con β -caroteno e infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> al siguiente día postratamiento (B5); y ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con β - caroteno e infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> al 8vo día postratamiento (B6)	51
Figura IV.	Histopatología de tejidos cutáneos provenientes de ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con vitamina A e infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> al siguiente día postratamiento (B3) y de ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con vitamina A e infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> al 8vo día postratamiento (B4).	52
Figura V.	Histopatología de tejidos cutáneos provenientes de ratones tratados preventivamente con isotretinoína por 15 días continuos e infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> al siguiente día postratamiento (B1) y ratones tratados preventivamente con isotretinoína por 15 días continuos e infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> al 8vo día postratamiento (B2).	53



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



Efecto antileishmanial del tratamiento preventivo con retinoides en ratones

BALB/c//BIO infectados experimentalmente

Autor: Br. Dilia D Jaimes Alarcón

Tutor(a): Dra. Loredana Goncalves Paredes

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios patógenos del género *Leishmania*, de los cuales existen diferentes especies responsables de las diversas manifestaciones clínicas, estas además se ven relacionadas con la respuesta inmunitaria del hospedero. Los retinoides son micronutrientes esenciales para distintos procesos biológicos, como son mantener la visión, promover el crecimiento, el desarrollo, y la protección de la integridad del epitelio. Entre los retinoides se encuentra el retinol o vitamina A (Vit A) la cual se conoce como vitamina antiinflamatoria debido a que está involucrada en el desarrollo y regulación del sistema inmunitario. Estudios de los últimos años han demostrado que cumple una función crucial en la formación morfológica del epitelio, queratinización epitelial, estratificación, diferenciación y maduración funcional de las células epiteliales. Por ello el presente trabajo evalúa el efecto antileishmanial del tratamiento con retinoides en ratones BALB/c//BIO infectados experimentalmente con parásitos de *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* por vía subcutánea. Sometiendo a los modelos múridos a un tratamiento preventivo por 15 días con una dosis de 1 $\mu\text{mol/Kg/día}$ de β -caroteno, vitamina A e isotretinoína. Promoviendo la búsqueda de nuevas terapias sobre la patología cutánea de modelos múridos infectados experimentalmente o induciendo un efecto tóxico sobre el parásito directamente.

Palabras clave: leishmaniasis, retinoides, respuesta inmunitaria, inmunoterapia

LISTA DE ABREVIATURAS

LC: Leishmaniasis Cutánea
LCL: Leishmaniasis Cutánea Localizada
LCA: Leishmaniasis Cutánea Americana
LMC: Leishmaniasis Mucocutánea
LCD: Leishmaniasis Cutánea Diseminada
LV: Leishmaniasis Visceral
β-C: Betacaroteno
Vit-A: Vitamina A
IT: Isotretinoína
APC: Célula Presentadora de Antígenos
MHCII: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II
UV: Ultravioleta
NK: Células Natural Killer
IL: Interleucina
ATRA: Ácido todo *trans* retinoico
AR: Ácido Retinoico
L. (L) mexicana: *Leishmania (Leishmania) mexicana*
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
Treg: Célula T reguladora
IFN: Interferón

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria metaxénica causada por diversas especies de protozoarios flagelados pertenecientes al género *Leishmania*, la cual difiere en cuanto a las manifestaciones clínicas, que van desde una úlcera cutánea hasta una enfermedad visceral; la distribución geográfica y vectores que la transmiten.

La enfermedad puede presentarse en diferentes formas clínicas dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada, la respuesta inmunitaria del hospedador y la relación del parásito con el hospedador.

Los retinoides tienen funciones importantes en el organismo, como en la visión, regulación de la proliferación y diferenciación celular, crecimiento óseo, función inmunitaria, activación de genes supresores de tumores, y crecimiento de las células epiteliales. Estos han adquirido la condición de ser modificadores de la respuesta inmunitaria, es por ello que en la siguiente investigación se evaluará el efecto antileishmanial del tratamiento con retinoides en ratones BALB/c//BIO infectados experimentalmente con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, sometiendo a los modelos múridos a un tratamiento preventivo con retinoides para que posteriormente observar la presencia de amastigotes y restos antigénicos en la lesión cutánea a través de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta, y describir las características histopatológicas por contraste con Hematoxilina de Gomori.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad granulomatosa, endémica de regiones con climas tropicales y subtropicales, causada por la infección con muchas especies y subespecies de protozoarios del género *Leishmania*, los cuales invaden y crecen dentro de las células histiocitarias (fagocíticas y presentadoras de antígenos) provocando lesiones inflamatorias crónicas en la piel y en las mucosas.

La toxicidad y los altos costos del tratamiento actual para la leishmaniasis, además de que la epidemiología está subestimada al existir casos no diagnosticados o personas asintomáticas; es un incentivo para considerar a los retinoides como posible tratamiento para lesiones tisulares causadas por *Leishmania (Leishmania) mexicana* debido a su capacidad de inmunoregular un amplio espectro de sistemas biológicos, particularmente a nivel cutáneo.

El daño tisular en esta enfermedad se debe a la respuesta inmunitaria del hospedador y al aumento de la carga parasitaria, por lo que el conocimiento de los efectos sobre los mecanismos antiinflamatorios que potencien la respuesta inmunitaria protectora del hospedador pudiera facilitar la búsqueda de blancos para nuevos tratamientos. Así, el estudio del efecto farmacológico de los agonistas para retinoides

sobre la histopatología cutánea de modelos múridos infectados experimentalmente con *Leishmania (Leishmania) mexicana* o sobre el parásito directamente, permitiría entender los mecanismos que determinen el resultado de la infección, ya sea hacia la cura o la persistencia de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad que es influenciada por una cantidad de factores que favorecen la dinámica entre los individuos y los vectores que transmiten el parásito, convirtiéndola en un problema de salud pública creciente en las zonas endémicas vulnerable desde el punto de vista nutricional, ya que se ha demostrado que la carencia de nutrientes esenciales como la vitamina A debilita el sistema inmunitario de los individuos, trayendo como consecuencia niveles altos de morbilidad.

En Venezuela la incidencia de la leishmaniasis aumenta progresivamente y su tratamiento es complejo de acuerdo a las manifestaciones clínicas; y además en muchos casos, no son específicos para la leishmaniasis, produciendo daños secundarios. Razón que hace relevante diseñar programas de investigación y formación en enfermedades infecciosas incluyendo la leishmaniasis cutánea, enfocadas en su control, y que incluyan nuevos tratamientos capaces de limitar la respuesta inflamatoria localizada y sistémica, con un mínimo de efectos secundarios.

Los aspectos antes mencionados justifican ampliamente esta investigación, que pretende evaluar el efecto de los agonistas selectivos para receptores nucleares de retinoides, los cuales modulan la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria cutánea, a fin de obtener resultados que permitan mejorar los ensayos terapéuticos ya existentes contra la leishmaniasis cutánea, creando un impacto positivo en el control de la enfermedad; dependiendo por supuesto, de si dicha respuesta producida conlleva a la cura o a la persistencia de la lesión.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General.

Evaluar el efecto antileishmanial del tratamiento con retinoides en ratones BALB/c//BIO infectados experimentalmente con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, en el Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, desde febrero de 2016 hasta julio de 2018.

Objetivos Específicos

- Inducir leishmaniasis cutánea mediante infección experimental con la especie *Leishmania (Leishmania) mexicana* en ratones susceptibles BALB/c//BIO.
- Obtener biopsias cutáneas a partir de tejidos infectados y congelados.
- Determinar la actividad terapéutica de los retinoides (isotretinoína, vitamina A y β -caroteno) en ratones con leishmaniasis cutánea, mediante la técnica Inmunohistoquímica de Inmunoperoxidasa Indirecta y análisis de tejidos cutáneos a través de la coloración por contraste con Hematoxilina de Gomori.

ALCANCES Y LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Alcances de la Investigación

La comprensión de la capacidad de los retinoides para ejercer regulación de la respuesta inmunitaria, antiparasitaria y antiinflamatoria frente a la infección causada por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, representaría el paso inicial para seleccionar un agente inmunoterapéutico, de gran valor para el control de la leishmaniasis cutánea.

Limitaciones de la Investigación.

Para las instituciones educativas de nuestro país la investigación queda limitada a determinados procesos de análisis, donde la carencia de insumos y reactivos limitan

los experimentos, ya que los alumnos y tesisas necesitan ser beneficiarios de la aplicación de las técnicas metodológicas que derivan del resultado de la investigación. Por lo tanto, en este trabajo, el número de animales de experimentación a analizar esta de alguna manera influenciado por los costos, y por lo tanto de la cantidad de biopsias de piel a obtener, por lo que los resultados serán el reflejo de una aproximación estadística de una metodología descriptiva.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

TRABAJOS PREVIOS

Es sabido que los retinoides tienen amplios efectos en la respuesta inmunitaria y en la histología de tejidos, sin embargo, no existe bibliografía sobre la función de los ácidos retinoicos (AR) en el tejido cutáneo de ratones infectados con *Leishmania (L) mexicana*.

A pesar de esto, existen varios trabajos que nos ayudan a comprender la eficacia de los retinoides en leishmaniasis. Así, por ejemplo: Bruna L. Lima Maciel y col., en el 2014 en su artículo “Dual Immune Modulatory Effect of Vitamin A in Human Visceral Leishmaniasis” analizaron el efecto de la vitamina A en un subconjunto de células T reguladoras (Treg) y monocitos aislados de niños sintomáticos con leishmaniasis visceral y de niños asintomáticos; que residen en una zona endémica para la leishmaniasis visceral en el noreste de Brasil, determinando que además de las complejas interacciones entre el parásito y la respuesta inmunitaria humana, otras variables como el estado nutricional pueden influir en el resultado de la infección por *Leishmania*. Los estudios han demostrado que la deficiencia de vitamina A en ratones parece estar asociado con el aumento de interleucina-10 (IL10), células Th2 y reducción en el desarrollo de Th1. Se demostró una correlación del nivel de vitamina A y las citoquinas en respuesta a la infección por *Leishmania*, también se observó un efecto doble de la vitamina A, en los niños asintomáticos, que indujo un perfil normal y en sujetos con leishmaniasis visceral impidió que IL10 aumentará después de la estimulación con antígenos de *Leishmania*, concluyendo que la vitamina A cumple también una función importante como factor regulador en la respuesta inmunitaria que

podría influir en el resultado de las infecciones por *Leishmania*. Durante la deficiencia de la vitamina A las células Treg pueden ser fuente importante en la producción de IL10, a pesar de la capacidad de las células Treg para suprimir la respuesta inmunitaria excesiva contra *Leishmania*, donde la mayoría de los estudios han demostrado que estas células pueden promover un control regulador excesivo que permite la replicación del parásito, la supervivencia y persistencia a largo plazo.

También se observó que el ácido todo-trans-retinoico reduce la producción de IL17 y la conversión de células, y el aumento de la IL4 y la disminución de la producción de interferón gamma (IFN γ).

En el 2017 Reigada Chantal y col., en su artículo “Trypanocidal Effect of Isotretinoin through the Inhibition of Polyamine and Amino Acid Transporters in Trypanosoma cruzi” evaluaron distintos fármacos para determinar sus capacidades de inhibir el TcPAT12, el cual es el único transportador de poliaminas esencial para la vida del *Trypanozoma cruzi*, entre estos fármacos se encuentran los retinoides, debido a que en trabajos previos se reporta que el retinol inhibe el crecimiento de *Leishmania* y disminuye la concentración de poliaminas intracelulares. Se estudiaron 7 tipos de retinoides con uso médico, que fueron empleados para acoplamiento enzimático con TcPAT12. De estas moléculas, la isotretinoína, conocida como tratamiento para el acné, demostró que inhibe el transportador de poliamina, lo que causa inanición de nutrientes desencadenando procesos autofágicos y apoptóticos como mecanismos inducidos para la muerte del parásito. Así concluyeron que la isotretinoína es promotora del efecto tripanocida ya que es un inhibidor multifactorial de transportadores de metabolitos esenciales.

Por otro lado, Scorza Breanna y col., en su artículo publicado en el año 2017 “Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis” discutieron los distintos síndromes cutáneos y la respuesta inflamatoria ante las diferentes especies de *Leishmania*. Describieron que la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) presentaba,

luego de 2 a 8 semanas después de la picadura, lesiones nodulares o papulares en el sitio de inoculación que podían progresar a úlceras bien delimitadas y la respuesta inmunitaria que desarrollaban era la producción de linfocitos T específicos productores de factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón gamma (INF γ), los cuales promueven el control del parásito activando a los macrófagos y produciendo un efecto microbicida, pudiendo matar al parásito. Observaron que la leishmaniasis mucocutánea (LMC) ocurría meses o años después de aparecer la primera lesión, y se caracteriza por presentar lesiones en las superficies de las mucosas de las vías respiratorias, las cuales expresaban mayormente interleucina 17 (IL17) y un elevado porcentaje de células T CD4⁺ que producían TNF e INF γ . En el caso de la leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) las lesiones son una mezcla de pápula tipo nodular y ulcerado, en la cual no hay producción de la respuesta celular tipo Th1 pero que se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada. Llegando a la conclusión de que las diferentes especies de *Leishmania* causan síntomas clínicos característicos, sin embargo, dependen de la especie que infecte y de un equilibrio de los factores pro y antiinflamatorios por parte del hospedero como es la respuesta inmunitaria ante la infección.

En el 2016 Torzecka, Jolanta D. y col. en su artículo “The use of isotretinoin in low doses and unconventional treatment regimens in different types of acne: a literature review” evaluaron la eficacia de isotretinoína como tratamiento para el acné y la frecuencia de los efectos adversos. Los cuales confirmaron que en pequeñas dosis y en terapias intermitentes, la isotretinoína tiene eficacia, administrando 20 mg por 7 días continuos, seguido de un descanso de 2 semanas, en esta terapia intermitente se incluye una buena tolerabilidad, de fácil manejo y bajos costos; con la desventaja de que las lesiones se mejoraban de manera lenta, pero con la ventaja que no se presentaban efectos adversos como: queratitis, rinitis, eritemas, cefalea, mialgias, un aumento de la bilirrubina, transaminasas, triglicéridos, disminución del colesterol (HDL) con incremento del colesterol (LDL). La mayoría de pacientes que presentaban acné de forma moderada preferían la dosis más baja de isotretinoína ya que era suficiente para

lograr una mejoría y además resultaba seguro ya que existían menos efectos adversos. Otros pacientes confirmaban también que la actividad en dosis bajas de isotretinoína reducía la producción de sebo y queilitis.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La leishmaniasis es una infección zoonótica causada por el protozoo que pertenece al género *Leishmania*. Lleva el nombre de *Leishmania*, por quien lo describió por primera vez (William Boog Leishman en 1901). A mediados de la década de 1900, el ciclo de transmisión y la vida del organismo *Leishmania* había sido confirmado científicamente. Desde entonces, muchos síndromes clínicos y numerosas especies y subespecies del protozoo morfológicamente similares han sido descubiertos (Bari, 2006).

La leishmaniasis es una enfermedad de la que pueden encontrarse antecedentes en épocas antiguas. Hay descripciones de leishmaniasis cutánea del año 650 a. C. en la antigua Babilonia. La misma enfermedad conocida en Oriente como "úlceras orientales" fue descrita por Avicena en el siglo X con el nombre de "úlceras de Balj", por la ciudad al norte del actual Afganistán. Posteriormente hay varios casos descritos en el Oriente Medio, por ejemplo, en Bagdad y Jericó, denominándola de diferentes formas. En los siglos XV y XVI, durante la colonización española de América, se describe la enfermedad en las zonas del actual Ecuador y Perú llamándola "lepra blanca"; en dichos lugares había evidencia de la presentación de la forma cutánea desde épocas preincaicas. Fernando de Oviedo en 1535, Pedro Pizarro en 1571, Fernando de Santillán en 1572, fray Rodrigo de Loayza en 1586, Diego de Morales en 1602, Reginaldo Lizárraga en 1605, Bartolomé de la Vega y el médico Cosme Bueno, describen la enfermedad que afecta a los indígenas de la ladera oriental de la cordillera de Los Andes, en los valles cálidos y húmedos donde se produce coca, produciéndoles destrucción de nariz y cavidades nasales (Bari, 2006).

En 1756, Alexander Russell, al examinar un paciente turco en Alepo, describió una lesión que deja cicatriz de por vida y que durante su evolución rara vez da mucho dolor. La llamó, "forúnculo de Alepo". (Sánchez et al., 2004). Cunningham en 1885 identifica a los parásitos como causantes de la enfermedad y Borowsky en 1898 distingue núcleo y kinetoplasto dentro de los amastigotes. En 1903, Leishman y Donovan, en la India, describen el protozoo causante del kala azar, y Ross establece el género *Leishmania* (Botet y Portús, 1993).

En el Nuevo Mundo, las primeras publicaciones de la enfermedad se deben a Lindenberg en 1909, Vianna en 1911, que clasifica el parásito como *Leishmania braziliensis*, y establece, en 1913, la utilidad de los antimoniales en el tratamiento, utilizando el tártaro emético (tartrato potásico antimónico), y Bates, que comunica el primer caso de leishmaniasis mucocutánea. Convit, en 1957, diferencia la leishmaniasis cutánea diseminada (Domingo, 2004).

Desde su introducción en la dermatología hace 60 años, los retinoides han adquirido la condición de fármaco indispensable en esta especialidad. Este hecho se debe tanto a la observación de resultados efectivos en un alto número de procesos cutáneos como por las innovaciones que se han realizado tanto en su estructura como en su formulación. En la actualidad su efectividad y seguridad está bien establecida, tanto en formulaciones tópicas como sistémicas, en acné, psoriasis y fotoenvejecimiento. En los últimos años se han descrito nuevas indicaciones de los retinoides en dermatología entre las que caben destacar su uso en el tratamiento del cáncer cutáneo, o con fines cosméticos con buenos resultados en cicatrización de las heridas, estrías cutáneas en fases iniciales o alopecia androgenética. En el caso del fotoenvejecimiento y cáncer cutáneo el fármaco ideal es la tretinoína y para el acné crónico y severo el fármaco de elección es isotretinoína por vía oral. Además, el adapaleno es la formulación tópica mejor tolerada en el acné; el tazaroteno es el primer retinoide tópico con efectividad en psoriasis, etretinato y acitretino se consideran de elección en el tratamiento sistémico de psoriasis. Por último, se han descrito de forma

reciente nuevas moléculas que han ampliado las indicaciones de los retinoides en dermatología, son alitretinoína para el sarcoma de Kaposi asociado a SIDA y bexaroteno para el linfoma cutáneo de células T (Fernández y Armario, 2003).

El retinol es necesario para el crecimiento, reproducción, visión y para la proliferación y diferenciación del tejido epitelial; especialmente de la piel. Los retinoides son derivados sintéticos de la vitamina A. En un sentido más amplio retinoides es un término genérico, que abarca los compuestos naturales con actividad biológica de la vitamina A. Los retinoides modulan la queratinización, tienen acción anticancerosa, acción antiinflamatoria, aumentan la síntesis de colágeno y modulan la respuesta inmunitaria (Montis, 1987).

ANTECEDENTES TEÓRICOS

Características Histológicas De La Piel

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo tanto por tamaño como por sus funciones. La piel separa al organismo del medio ambiente externo y a su vez, permite su comunicación con él mismo. Es una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicos, calor, frío, radiaciones ultravioleta (UV) y microorganismos patógenos. Además, la piel es esencial para el mantenimiento del equilibrio de fluidos corporales actuando como barrera ante la posible pérdida de agua, el mantenimiento del equilibrio térmico y la transmisión de una gran cantidad de información externa que accede al organismo por el tacto, la presión, temperatura y receptores del dolor (Navarrete, 2003).

Histológicamente la piel está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis.

Epidermis: Es la parte más superficial de la piel y está constituida por un tejido epitelial estratificado plano queratinizado. Presenta un espesor variable, con un valor

medio de 0,1 mm, pudiendo alcanzar en zonas como las plantas de los pies y las palmas de las manos espesores de hasta 1 ó 2 mm. Es la capa de la piel con mayor número de células y con una dinámica de recambio extraordinariamente grande (Arenas, 2010).

La epidermis histológicamente está compuesta normalmente por cinco capas diferentes (Figuran I) que desde el exterior hacia el interior serían:

Capa córnea: Compuesto por una serie de células de apariencia amorfa, planas y acidófilas, por lo que con los colorantes de rutina (hematoxilina y eosina) se tiñe únicamente por la eosina, no contienen núcleos ni organelas citoplasmáticas. Estas células son los queratinocitos, células en última etapa de diferenciación, donde todo el citoplasma está lleno de queratina (Nesbitt y Ackerman, 2001).

Se considera que la epidermis está formada por queratinocitos, debido a la capacidad de estas células de sintetizar queratina. La queratina es una familia de proteínas estructurales insolubles en agua y con una gran resistencia frente a cambios de pH y de temperatura. También presentan fuerte resistencia a la degradación enzimática (Young y Heath, 2004).

Estrato lúcido: Esta capa no es fácil de apreciar y cuando aparece lo hace como una línea clara y brillante, por encima del estrato granuloso. Se observa solo en las regiones sin pelo, en especial en las almohadillas plantares y en la piel nasal (Nesbitt y Ackerman, 2001); está compuesto por varias capas de células claras queratinizadas que carecen de núcleo y de organelas citoplasmáticas (Navarrete, 2003). Estas células presentan filamentos de queratina que se disponen en forma paralela con la superficie de la piel, y eleidina, que se forma por la licuefacción de la queratohialina, este estrato solo se encuentra en piel gruesa (Young y Heath, 2004).

Estrato granuloso: Es generalmente discontinuo y regularmente solo tiene una capa de células de grosor en la piel cubierta de pelo, pero puede tener dos células de

grosor en los infundíbulos y llegar hasta ocho células en las almohadillas plantares. Está compuesta de queratinocitos nucleados que se distinguen por los gránulos azul oscuros de queratohialina, ya que se tiñen intensamente con colorantes básicos. Estos contienen profilagrina, el precursor de la matriz proteica que pega entre sí los filamentos de queratina. En esta capa es característica la presencia de los gránulos laminares (cuerpos de Odland, queratinosomas, cuerpos laminares o gránulos recubridores de membrana) los cuales forman parte del componente lipídico intercelular de la barrera de permeabilidad de la unión granulosa-córnea. Su grosor depende del de la capa córnea (Navarrete, 2003), en esta capa es donde mueren las células epidérmicas (Ham y Cormack, 1983).

Estrato espinoso, escamoso o Malpighiano: Está compuesto de una o más capas de células poligonales unidas por puentes intercelulares o desmosomas, el cual son estructuras que sirven como medio de unión entre ellas y a la vez con las capas adyacentes (Ham y Cormack, 1983). Las células del estrato espinoso que están limitando con las células del estrato basal, son mitóticamente activas como estas, de tal manera que ambos estratos se encargan de la renovación epidermal (Virga, 2003). El número de estas células también varía dependiendo de la región corporal de que se trate, en general es de cinco a siete hileras. Se tiñen pálidamente con la hematoxilina (Navarrete, 2003).

Capa basal, germinal o germinativa: Está constituida por una sola fila de células que descansa sobre la lámina basal se disponen generalmente en una hilera, se tiñen intensamente con la hematoxilina, tienen puentes intercelulares que son menos evidentes que los de la capa espinosa. Estas células son de forma cuboidea o cilíndrica, presenta citoplasma basófilo, posee escasas mitocondrias, Complejo de Golgi pequeño, poco desarrollo de retículo endoplasmático granular y abundantes ribosomas libres (Rodríguez, 2004). Además, presenta un citoesqueleto de filamentos de queratina de 10nm de diámetro (Navarrete, 2003).

Existen numerosos desmosomas, tanto entre células basales vecinas, como también con las células del estrato espinoso. En la zona basal hay hemidesmosomas que unen estas células con la lámina basal. En esta capa la mitosis es activa, lo cual origina nuevas células que van ascendiendo hacia la capa superior (Ham y Cormack, 1983).

Aunque los queratinocitos constituyen el 80% de las células epidérmicas, en la capa basal pueden observarse otros tipos celulares: los melanocitos, y las células de Langerhans (Young y Heath, 2004).

Los melanocitos, que suponen alrededor del 10% de las células epidérmicas y son las células encargadas de la síntesis de melanina, pigmento que da color a la piel y protección frente a los rayos UV, cuya cantidad varía de acuerdo al tipo de piel de cada individuo.

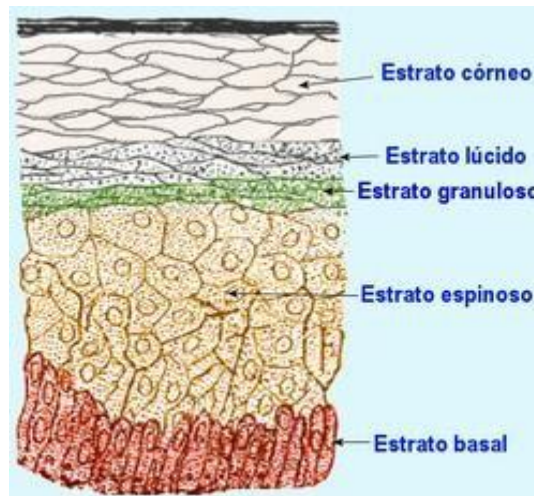
Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno (APC) de origen hematopoyético derivadas a partir de una célula madre pluripotencial presente en la médula ósea y, según sea el microambiente de citoquinas que rodea su desarrollo, da origen a células precursoras de células dendríticas de tipo mieloide o linfoide las cuales difieren no sólo en su fenotipo sino también en su localización anatómica y en su función, reconocidas por su capacidad de iniciar una respuesta inmune y estimular respuestas de memoria al activar linfocitos T vírgenes y linfocitos T activados y/o efectores, respectivamente. Las CD dentro de la población de leucocitos son las células mejor equipadas para ejercer su función de inmunovigilantes, ya que se encuentran localizadas en lugares estratégicos: tejido linfoide asociado al tracto respiratorio y cutáneo, espacio intersticial, y sangre, además de expresar diferentes moléculas de adhesión que les permiten migrar literalmente a todos los tejidos de nuestro organismo y atravesar a los diferentes tejidos sin alterar la barrera epitelial (Iglesias M, 2003). Estas tienen la capacidad de evolucionar de células dendríticas inmaduras (con una alta capacidad para capturar antígenos propios y no propios) a células dendríticas maduras

(con una alta capacidad de presentar antígenos y activar a las células T) (Nesbitt y Ackerman, 2001).

Además, las células dendríticas expresan elevada densidad de moléculas del MHC clase I y II, moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 y producen citoquinas como IL12 e IL4, propiedades que las convierten en potentes células presentadoras de antígenos y, por tanto, su participación es crucial no sólo en la respuesta inmune primaria sino también en la inducción de la tolerancia inmune. Entre las diferentes subpoblaciones de células dendríticas se encuentran las células de Langerhans, descritas en 1868 por Paul Langerhans, presentes en la dermis reticular y, por tanto, cumplen un papel fundamental en la respuesta inmunitaria cutánea ya que son potentes estimuladores de la respuesta específica mediada por células T. Las células de Langerhans se encuentran preferiblemente en la epidermis y constituyen alrededor del 3% del total de las células presentes en este tejido (Zuluaga y Robledo, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Figura I. Capas de la piel. Donde se observan sus diferentes estratos en epidermis



Dermis: Es la estructura de soporte de la piel, está situada por debajo de la epidermis, dentro de las funciones que ejerce esta capa de piel tenemos, protección mecánica, unión de agua, regulación térmica y es receptora de estímulos sensitivos. Los vasos sanguíneos de la dermis contribuyen al control de la temperatura, la presión

y coagulación sanguínea, participan en la reparación de heridas, remodelación de tejidos y procesos inmunes como la acción microbicida, tumoricida, y secreción de citoquinas, entre otras moléculas inmunomoduladoras. También está involucrada en la aterogénesis (Wolff, Weinberger y Grubeck, 2012).

Está formada básicamente de tejido conectivo fibroelástico. El tejido conectivo a su vez está formado por tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y reticulares. Las fibras colágenas son las más numerosas, la disposición y el grosor de las mismas, varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: en la dermis superficial o papilar son fibras delgadas, a diferencia de la dermis media y profunda, donde son más gruesas y se disponen en haces casi paralelos a la superficie de la epidermis. Las fibras elásticas son fibras delgadas de 1 a 3 μ m de diámetro, el grosor al igual que el de la fibra colágena y varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: delgadas en dermis superficial y gruesas en dermis profunda (Navarrete, 2003).

Las fibras reticulares miden de 0.2 a 1 μ m de diámetro, son un tipo especial de fibra colágena de tipo III el cual son sintetizados por las células del músculo liso, fibroblastos, y glía. Esta proteína otorga resistencia y dureza dando capacidad de sostén a estos tejidos que son flexibles y deben encogerse y expandirse periódicamente (Wojciech, 2015).

Histológicamente, se divide en dos capas, que desde el exterior al interior son, la capa papilar y la capa reticular. La capa papilar recibe ese nombre por la presencia de proyecciones hacia el interior de la epidermis, estas proyecciones se denominan papilas dérmicas y se alternan con los procesos interpapilares de la epidermis. En las papilas se encuentran las asas capilares (sistema circulatorio) que proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular. La capa papilar también contiene numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos. La capa reticular es más gruesa que la capa papilar, está formada por tejido conectivo denso irregular de tal manera que hay fibras colágenas gruesas densas que se hallan entrelazadas, además hay fibras

reticulares y muchas fibras elásticas. Estas últimas son las que proporcionan la elasticidad a la piel. La dirección predominante de todas las fibras es paralela a la superficie cutánea. El intersticio entre los haces de fibras está ocupado por una matriz amorfa rica en dermatánsulfato y otros glucosaminoglucanos (Wolff, Weinberger y Grubeck, 2012).

Además de fibroblastos, existen mastocitos, linfocitos, macrófagos y ocasionalmente células adiposas. En esta capa se encuentran glándulas sudoríparas sebáceas y folículos pilosos; existen los músculos erectores del pelo, que se insertan en los folículos pilosos (Iglesias M, 2003)

Hipodermis: Es el tejido subcutáneo que se localiza por debajo de la capa reticular de la dermis. No es parte de la piel, sino que aparece como una extensión profunda de la dermis. Es un tejido conjuntivo conformado principalmente por células adiposas (Wojciech, 2015). La densidad y disposición de la capa subcutánea determina la movilidad de la piel. La hipodermis permite el aislamiento térmico del cuerpo. Donde las células adiposas tienden a acumularse y se forman almohadillas de grasa que se le denomina panículo adiposo (Young y Heath, 2004). De igual forma, la piel también tiene elementos anexos como: folículos pilosos, glándulas sudoríparas, pelos y vasos sanguíneos.

Cambios histopatológicos asociados al tejido cutáneo

Existen diferentes alteraciones asociadas a la epidermis entre ellas tenemos:

Hiperqueratosis: Engrosamiento de la piel provocado por la acumulación excesiva de queratina de células muertas descamadas, dando origen a callos o callosidades, ya que no permite la renovación adecuada de las capas externas de la piel debido a fricción constante, inflamación crónica, eccema (hinchazón de la piel) o por trastornos genéticos como la ictiosis (piel de pescado). Cuando dicha hiperqueratosis

adquiere un grosor excesivo no puede acoplarse a la elasticidad del resto de la piel, al resultar más densa y rígida que los demás estratos que componen el tejido epitelial, por este motivo se produce la separación de esta capa externa del resto de la piel. La mayoría de las formas de hiperqueratosis es indolora. Aunque la hiperqueratosis puede presentarse en cualquier parte de la piel, existen muchas áreas que generalmente se ven afectadas (Farmer y Hood, 2000).

Además, podemos encontrar la hiperqueratosis absoluta el cual es el aumento en el grosor y densidad óptica de la capa cornea, y la hiperqueratosis relativa que es la disminución de la capa espinosa (Magaña y Magaña, 2011).

Ortoqueratosis: Es aquella donde la capa córnea se observa sin presencia de núcleo, (Magaña y Magaña, 2011). Presencia de células superficiales escamosas, queratinizadas de aspecto normal (planas, anucleadas y con citoplasma homogéneo); es decir, aquella en que la muerte celular es completa y, por tanto, no queda ningún resto nuclear visible dentro del corneocito que, sin embargo, conserva sus límites celulares (Urbina, 2001).

Paraqueratosis: Queratosis imperfecta en donde las células no han alcanzado su grado de maduración completa y en ésta no se distingue perfectamente el estrato granuloso del epitelio, y observamos una capa de queratina dentro de la cual vemos núcleos picnóticos (Farmer y Hood, 2000).

Hiperplasia epidérmica endofítica: Engrosamiento de la epidermis por efecto del aumento en el número de sus células (Magaña y Magaña, 2011). Se reconocen cuatro perfiles: psoriasiforme, en que la hiperplasia es más o menos regular en cuanto al tamaño de sus procesos interpapilares y la preservación de la unión dermo-epidérmica; hiperplasia irregular, en que no hay esa regularidad de la anterior y existe pérdida de la unión con la dermis; papilada, en que los crecimientos epidérmicos sobresalen del nivel de la superficie de la piel; pseudocarcinomatosa, pérdida de la

estructura papilar con conos irregulares ensanchados que penetran profundamente en la dermis (Urbina, 2001).

Acantosis: Es el término utilizado para designar el engrosamiento de la epidermis, habitualmente debido a un aumento del grosor del estrato espinoso (capa de células espinosas). Es una característica común de muchas enfermedades de la piel, particularmente de inflamaciones crónicas (Stevens, Lowe y Young, 2003).

La acantosis o hiperplasia es tan grande que el epitelio crece superficialmente y en profundidad enviando sus prolongaciones o papilas profundamente hacia el conjuntivo subyacente. Este fenómeno origina una imagen donde pareciera que el epitelio "infiltrara" al conjuntivo, es decir, que fuera un tumor maligno, pero si se observa bien se verá que aunque parezcan aisladas algunas islas de epitelio, todas conservan su capa basal y su membrana basal (Wolff, Weinberger y Grubeck, 2012).

Hipoplasia: Es una característica que se asocia a la capa espinosa donde se está disminuyendo el número de células espinosas que constituyen a la segunda capa de la epidermis, dando lugar a un adelgazamiento epidérmico (Magaña y Magaña, 2011).

Atrofia: Reducción de tamaño de las células epidérmicas, es decir, después que el órgano normalmente desarrollado alcanzó el tamaño normal, suele acompañarse de disminución o pérdida de la cresta. La atrofia puede darse en diversos niveles de organización: en células aisladas, tejidos y órganos (Wolff, Weinberger y Grubeck 2012).

La pérdida de masa protoplasmática en la atrofia afecta principalmente al parénquima de los órganos, por eso en los órganos atróficos el estroma suele ser prominente y parecer aumentado, como se observa típicamente en el bazo (Sánchez et al., 2004).

Dentro de las alteraciones celulares que presenta la epidermis podemos encontrar las siguientes:

Infiltrado celular: Es una inflamación representada por células de tipo macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y plasmocitos (Balkwill y Mantovani, 2001).

Granuloma: Son formaciones nodulares de carácter inflamatorio productivo, por lo común de 1 a 2 mm de diámetro, constituidas esencialmente por macrófagos. Ellas se explican por la presencia local de un agente causal insoluble. En los granulomas puede haber fenómenos alterativos, como necrosis, además, otras células de carácter inflamatorio, como polimorfonucleares, linfocitos y plasmocitos; puede haber neoformación de vasos, fibroblastos y fibras colágenas (Sánchez et al., 2004).

En la evolución de algunos granulomas se observa un reemplazo de los macrófagos por fibroblastos y un progresivo aumento de fibras colágenas hasta la formación de una cicatriz. Los macrófagos pueden desencadenar una proliferación local de fibroblastos y además estimularla formación fibras de colágeno (fibroblastos facultativos) (Wolff, Weinberger y Grubeck, 2012).

En algunos granulomas predominan las células epiteloideas, que son macrófagos transformados en células principalmente secretoras y con menor capacidad macrofágica (Sánchez et al., 2004).

Fibrosis: Es la característica designada por la transformación de algunos tejidos en un tejido compuesto por fibras cercanas al tejido conjuntivo. Suele aparecer a raíz de una lesión tisular o de la inflamación de un tejido donde éstos no se regeneran correctamente: los tejidos inicialmente sanos se sustituirán por estos otros tejidos fibrosos. Cuando existe una lesión de los tejidos orgánicos la evolución normal se hace hacia la cicatrización, es decir la sustitución de las células muertas por células idénticas

cuyas funciones se conservan. En caso de desequilibrio en este fenómeno de reparación, hay una producción excesiva de colágeno lo que conduce hacia la fibrosis (Wolff, Weinberger y Grubeck 2012).

De igual forma, también existen otras alteraciones que afectan la capa hipodérmica, algunas de ellas se describen como:

Necrosis tisular: Degeneración del tejido por la muerte de sus células. Esta mortalidad es producida por la acción de un agente nocivo que genera una lesión irreparable (Montserrat, Fortuño y González, 2008).

Existen diversos tipos de necrosis entre ellos: necrosis tisular coagulativa, que corresponde a un conjunto de alteraciones de una célula muerta que pueden verse con microscopio óptico cuando una célula muere, su perfil se mantiene durante los primeros momentos y, si se tiñe con la combinación habitual de hematoxilina y eosina, el citoplasma de la célula necrótica se verá vacuolado y más eosinófilo de lo habitual. El núcleo muestra un agrupamiento inicial de la cromatina, al que sigue su redistribución a lo largo de la membrana nuclear; necrosis caseosa, la cual se refiere a la destrucción celular con restos granulares; necrosis licuefactiva, se da cuando la velocidad de disolución de las células necróticas es muy superior a su capacidad de reparación, donde los polimorfonucleares de una reacción inflamatoria aguda poseen potentes hidrolasas capaces de digerir a las células muertas (Wojciech, 2015).

Vasculitis: Grupo heterogéneo de entidades clínicas etiológicamente inespecíficas, que suelen presentarse con o sin manifestaciones sistémicas. Tradicionalmente han sido definidas como procesos clínico-patológicos caracterizados por inflamación y daño de los vasos sanguíneos (vénulas, capilares, arteriolas de mediano y gran calibre), produciendo las manifestaciones clínicas de acuerdo con la región irrigada, asociándose a necrosis o a trombosis, es decir que las vasculitis pueden ser generalizadas o localizadas (Carlson y Chen, 2006).

***Leishmania*.** Es un protozoo unicelular dimorfo perteneciente a la clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae (Tabla I). El género *Leishmania* (Ross en 1903) incluye más de dos docenas de especies, la mayoría de las cuales parasita al ser humano (Domingo, 2004).

Tabla I. Taxonomía de *Leishmania*.

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)

(Domingo, 2004).

Leishmania es un parásito digénico, que en su ciclo de vida se presenta en dos estadios: 1) Promastigote: que representa la forma extracelular infectante, caracterizado por ser elongado y fusiforme, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores, mide aproximadamente de 12 a 20 μm , posee un núcleo central y un flagelo anteronuclear que nace del cuerpo basal situado delante del kinetoplasto, necesario para su movilidad en el intestino de los artrópodos vectores (dípteros); y 2) Amastigote: que representa la forma replicativa intracelular obligado y se encuentra dentro del sistema retículoendotelial del mamífero hospedero, presenta una forma redondeada u oval, mide de 3 a 7 μm , posee un núcleo oval excéntrico, un kinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal, aunque carece de flagelo presenta un rizoplasto que se convertirá en flagelo en el promastigote (Vera, Vega, Quintanilla y Arenas, 2006).

El género *Leishmania* está dividido en dos subgéneros: *Leishmania*(L.) y *Viannia* (V.), según el sitio en que se desarrollen en el intestino del insecto transmisor. La localización de *Leishmania* es suprapilórica, próxima a la probóscide, mientras que *Viannia* se aloja en las porciones media y posterior del intestino. Por lo que a los subgéneros *Leishmania* (L.) y *Viannia* (V.) de acuerdo con el sitio de unión y desarrollo en el intestino del mosquito, se denominan suprapilarios y peripilarios, respectivamente (Vera et al., 2006)

www.bdigital.ula.ve

Tabla II. Clasificación del género *Leishmania*.

GÉNERO	SUBGÉNERO	COMPLEJO	ESPECIE
<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>L.donovani</i>	<i>L.donovani</i>
			<i>L.infantum</i>
			<i>L.chagasi</i>
			<i>L.Tropica</i>
		<i>L.tropica</i>	<i>L.Major</i>
			<i>L.Aethiopica</i>
			<i>L.Killicki</i>
			<i>L.Mexicana</i>
		<i>L.mexicana</i>	<i>L.Amazonensis</i>
			<i>L.Garnhami</i>
			<i>L.Pifanoi</i>
			<i>L.Venezuelensis</i>
	<i>Viannia</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.Braziliensis</i>
			<i>L.Panamensis</i>
			<i>L.Guyanensis</i>
			<i>L.Peruviana</i>
			<i>L.Colombianensis</i>
			<i>L.Equatorensis</i>
			<i>L.Lainsoni</i>
			<i>L.Naiffi</i>
			<i>L.shawi</i>

(Botero y Restrepo. 2005).

Ciclo Biológico. Para alimentarse, la hembra del insecto vector pica al mamífero reservorio. De este modo, los amastigotes de los tejidos infectados o de la sangre pasan al tracto digestivo del mosquito y en el intestino medio, fundamentalmente, se transforman en promastigotes en 24 a 36 horas tras la picadura, e inician una rápida multiplicación. Dentro del tubo digestivo del vector, las características del

promastigote van cambiando desde la fase de nectomona, sujeto a las microvellosidades del tubo digestivo, a la de promastigote infectivo o metacíclico, libre en hipofaringe, pasando por una fase intermedia de haptomona. Este proceso se conoce como metaciclogénesis y dura unos 10 días. Los promastigotes metacíclicos rellenan la faringe y probóscide del mosquito y permanecen allí hasta una nueva picadura, momento en el que serán inoculados a un nuevo hospedero. Con cada picadura entran en la dermis entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos, algunos de los cuales, probablemente, son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos, mientras que otros se adhieren a los receptores de superficie de los macrófagos y son fagocitados. Una vez dentro del macrófago, se va reduciendo el tamaño del flagelo y el cuerpo se va ovalando (paramastigote) hasta transformarse nuevamente en amastigotes, que vivirán en los fagolisosomas, o vacuolas parasitóforas del macrófago. En estas estructuras, los amastigotes sobreviven y se multiplican por división binaria, hasta que el macrófago queda repleto de amastigotes, momento en el que se rompe y los parásitos pasan al espacio extracelular, donde serán nuevamente captados por otros macrófagos (García, 2004).

Leishmaniasis. La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que dependiendo de la especie y de la respuesta inmunitaria del hospedero, adopta diferentes formas clínicas, según su pronóstico y terapéutica, se comportan como enfermedades diferentes y se clasifican en: 1) Infecciones inaparentes que curan espontáneamente, 2) Leishmaniasis cutánea (LC) con úlceras cutáneas que pueden presentarse a) con una única lesión de manera localizada (LCL) o b) con varias lesiones de manera difusa (LCD), 3) Leishmaniasis mucocutánea caracterizada por lesiones inflamatorias crónicas en mucosas (LMC) y 4) Leishmaniasis visceral (LV) causando infección sistémica diseminada potencialmente fatal (López et al., 2011).

Leishmaniasis Cutánea. Como se mencionó anteriormente, esta forma puede clasificarse como leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o difusa (LCD). La Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) se presenta en áreas expuestas a la picadura

de insectos (cara, tronco y extremidades), entre dos a cuatro semanas después de ésta. En el sitio de la picadura aparece un nódulo eritematoso asintomático de 1 a 10 cm de diámetro, que en el transcurso de 1 a 3 meses se agranda y transforma en una úlcera de bordes indurados, de coloración violácea, redondeadas, y de fondo limpio e indoloro si no están infectadas secundariamente. Los sujetos con LCL ocasionalmente curan espontáneamente en un lapso de 6 meses a 4 años, dejando una placa deprimida y discrómica con telangiectasias. Se llama forma abortiva si la lesión es una “pápula” regresiva; botón macho si es un nódulo no ulcerado y botón hembra cuando es un nódulo ulcerado (Vera et al., 2006).

Cuando afecta los pabellones auriculares, causa la forma cutáneo condral o úlcera de los chicleros, este tipo de lesión es causada principalmente por *L. (L.) mexicana*. Esta especie genera lesiones leves y no produce metástasis nasofaríngeas; comienza con una lesión, como la picadura de un insecto, que genera una placa infiltrada o úlcera crónica, de fondo exudativo, a menudo indolora; sin embargo, casi siempre es dolorosa especialmente al tacto, cuando tiene sobreinfección, que puede curar espontáneamente a largo plazo y dejar mutilaciones en forma de muesca (López et al., 2011).

La leishmaniasis cutánea difusa o tegumentaria llamada así porque se han encontrado parásitos aún en zonas sin nódulos, se caracteriza por falta de respuesta inmunitaria celular hacia antígenos del parásito, permitiendo la diseminación incontrolada de éste, con desarrollo de lesiones en casi toda la piel, con excepción del cuero cabelludo y en ocasiones las mucosas. En esta forma clínica el parásito se disemina lentamente por el líquido tisular, por la linfa o por vía sanguínea. El agente etiológico descrito generalmente pertenece al complejo *L. mexicana* que predomina en zonas expuestas como pabellones auriculares, mejillas y extremidades; se caracteriza por nódulos y placas infiltradas de superficie lisa o verrugosa, de color pardo rojizo y consistencia firme, que pueden o no ulcerarse. Pueden observarse linfedema, linfadenopatía, mal estado general y en ocasiones fiebre (Vera et al., 2006).

Tratamiento. La leishmaniasis cutánea se puede curar sola a corto y largo plazo. Dan muy buen resultado los antimoniales trivalente por vía parenteral, como el Repodral y la Antiomalina, 2 a 3 ml (0.02 a 0.03 g) en días alternos en series de 12 a 20, y los pentavalentes como glucantine (antimoniato deneglumina), 10 a 60 mg/kg por 12 días a tres semanas, o hasta obtener datos de curación clínica y parasitológica, y el pentostam (estibogluconatosódico) 20 mg/kg/día, por 20 días. En las formas cutáneas, o ante riesgo cardiovascular, también pueden inyectarse antimoniales por vía intralesional, 0.2 a 1.5 ml cada semana; habitualmente se realiza cada tercer día, con un número de 10 a 12 aplicaciones en total hasta la curación clínica, no la parasitológica, ya que pueden existir parásitos sin la enfermedad (Weigel et al., 1994).

Los efectos adversos de los antimoniales pueden ser reacción local, anorexia, náusea, vómito, mialgias, artralgias, aumento de enzimas hepáticas, y alteraciones electrocardiográficas. Una alternativa es el tratamiento combinado con antimoniales pentavalente e inmunoterapia con vacuna de promastigotes muertos (Alvarado et al., 1985).

En algunos casos de leishmaniasis cutánea ha sido útil la diaminodifenilsulfona, 3 mg/kg/día por 3 semanas. En casos *por L. mexicana* hay respuesta al ketoconazol 200-600 mg/día, o al itraconazol, 200-400 mg/día, durante 1 a 2 meses. También se han usado rifampicina, 600 a 1200 mg/día por más de 2 meses sola o con isoniazida; interferón- γ y alopurinol 20 mg/día, metronidazol, 250 mg 3 veces al día en ciclos de 10 a 15 días; trimetoprim-sulfametoxazol 160/800 mg 2 veces al día durante 4 semanas. Incluso se ha usado la lidocaína con buenos resultados. Existen nuevos avances terapéuticos que se desarrollan activamente como medicamentos portadores de blancos específicos para la localización del parásito, reduciéndose los efectos adversos; uso de inmunomoduladores; evaluación de los productos naturales; estudios de farmacocinética y combinaciones (Vera et al., 2006).

Localmente deben usarse antisépticos, algunos recomiendan sulfato de paromomicina a 15% y cloruro de metilbenzetonio a 12% dos veces al día por 10 días a 3 semanas o solución de sulfato de bleomicina al 1% por vía intralesional (Harrissont y Wintrobe., 1973). También se ha recurrido con eficacia relativa a termoterapia, criocirugía, legrado (curetaje), láser y radioterapia (Marinkelle y Rodríguez., 1981).

Respuesta Inmunitaria Anti-Leishmania. La infección por *Leishmania* generalmente induce una respuesta inmunitaria compleja que varía dependiendo de diferentes factores: forma clínica de la enfermedad, especie de *Leishmania* implicada en el proceso infeccioso y la cronicidad de la enfermedad. Se genera un espectro de respuesta inmunitaria que incluye mecanismos inmunes inespecíficos (por ejemplo: reacciones inflamatorias) hasta mecanismos inmunes específicos mediados por células o por anticuerpos (Agudelo y Robledo, 2000).

Respuesta innata. Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son las primeras células que migran al sitio de la infección y cumplen una función doble. Por una parte son la primera línea de defensa contra el parásito y por otro, en su interior los promastigotes encuentran un lugar adecuado para sobrevivir, transformarse y multiplicarse (Cortés, 2011). Las células fagocíticas secretan citoquinas como la IL8, que atrae nuevos PMN al lugar de infección. Los PMN circulan por el torrente sanguíneo durante un corto período de tiempo, después del cual inician la apoptosis. *Leishmania* es capaz de retrasar esta apoptosis hasta 24 horas para aplazar las defensas del hospedero. Los PMN pueden diferenciarse en CD28+ ó CD28-. Los PMN CD28+ interaccionan con los monocitos- macrófagos y las células dendríticas, que llegan al lugar de la infección. Esta interacción activa la síntesis de IFN γ e IL12, los cuales incrementan la producción de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y permiten que se transformen en células presentadorasde antígeno (APC). Por otra parte, los macrófagos fagocíticos ingieren PMN CD28- apoptóticos con los parásitos en su interior. De esta manera se activa mínimamente la función microbicida, ya que el parásito penetra el macrófago enmascarado por la célula

apoptótica. Cuando el promastigote es internalizado en el fagosoma del macrófago, se le fusionan los lisosomas formando el fagosoma final. En el fagosoma los parásitos son destruidos por enzimas proteolíticas (Carrión, 2007).

Las células dendríticas y otras APC migran llevando los parásitos desde la zona de inoculación hasta los ganglios linfáticos regionales, donde presentan los antígenos de *Leishmania* a través de las moléculas del MHC-II a las células T CD4⁺ para estimular la respuesta celular específica. La presentación involucra la presencia de otras moléculas coestimuladoras como CD40 y CD80 que activan la producción de IL12. Esta citoquina aumenta la producción de IFN γ que puede unirse a los receptores del macrófago e inducir la muerte del parásito (Cortés, 2011).

Respuesta antígeno específica. El establecimiento de una respuesta inmunitaria protectora frente a *Leishmania* requiere la presentación de antígenos apropiados por parte de las APC, la inducción y expansión de linfocitos Th1 y la activación de los macrófagos para una eficiente eliminación del parásito. Una de las células presentadoras de antígenos más importantes, para *Leishmania*, son las células dendríticas. Estas presentan una variedad de receptores de membrana que facilitan el reconocimiento y la captura del patógeno para ser procesado y presentado eficientemente. (Cortés, 2011).

Estudios en ratones han permitido determinar los patrones de diferenciación y el perfil de citoquinas implicadas en la resistencia y susceptibilidad a la enfermedad. Así, los linfocitos T, pueden diferenciarse en varias subpoblaciones como son: Th1, Th2, Treg y Th17, caracterizadas fenotípicamente por la secreción diferencial de diversos mediadores solubles como citoquinas y quimioquinas. Dentro de las moléculas específicamente secretadas por cada tipo celular podemos decir que las células Th1 producen activadores de la respuesta inmunitaria celular tales como el IFN γ que conlleva a la eliminación del parásito. Por otra parte, las células Th2 secretan citoquinas como la IL4, IL5 e IL13, que junto a IL10 de las células Treg suscitan la

desactivación de los macrófagos y el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria humoral que no es del todo eficiente para eliminar el parásito (Carrión, 2007).

Actualmente se desconocen los factores exactos que dirigen o determinan la expansión de una u otra subpoblación de células T colaboradoras (Th). Sin embargo, se ha observado que cuando existe una gran cantidad de antígeno, cuando éste es soluble, o cuando el linfocito B se comporta como célula presentadora de antígeno, la respuesta es de tipo Th2. Al contrario, la respuesta es de tipo Th1 cuando hay presencia de poco antígeno o la célula presentadora de antígeno es el macrófago o las células dendríticas (Agudelo y Robledo, 2000).

Las citoquinas de tipo Th1 participan en la regulación del granuloma y en la activación de macrófagos inflamatorios para aumentar su capacidad microbicida, mientras las citoquinas de tipo Th2 regulan la producción de anticuerpos por los linfocitos B y el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo humoral (Carrión, 2007).

En la leishmaniasis, la eliminación del parásito depende de la activación de la célula hospedera; por lo tanto, la producción de citoquinas activadoras de macrófagos se correlaciona con curación, mientras que la de citoquinas que desactivan el macrófago se correlaciona con enfermedad. En esta forma, el mecanismo por el cual se activan las células Th1 o Th2 es importante para dirigir la respuesta inmunitaria hacia protección y curación o susceptibilidad y patogénesis (Agudelo y Robledo, 2000).

Los estudios realizados en humanos para tratar de correlacionarlos patrones de citoquinas producidas por células T y las formas clínicas de la leishmaniasis han mostrado un perfil mezclado de citoquinas. En los pacientes con leishmaniasis cutánea difusa hay un predominio de citoquinas tipo Th2, ya que no hay producción de IFN γ , ni IL12, pero sí presentan significativos niveles de IL5 y TNF α . La leishmaniasis

cutánea se caracteriza por un patrón de citoquinas tipo Th1 con producción de IL12 e IFN- γ en niveles significativos (Cortés, 2011).

Modelo Experimental.

Las principales cepas de ratones utilizadas en el estudio del parásito (C57BL/6, C3H, CBA) la infección genera lesiones cutáneas similares a las de los humanos. Estas lesiones se curan de forma espontánea debido a que estas cepas generan una respuesta tipo Th1 cuyo principal producto es el IFN- γ . Esta citoquina induce la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos parasitados, iniciando así el proceso de destrucción y eliminación del parásito. El balance de la respuesta Th1/Th2 esta mediado por las diferentes citoquinas sintetizadas por las APC, de esta forma altas dosis de IL4 inducen una respuesta Th2 y por otra parte, la presencia de IL12 induce la respuesta del tipo Th1. Otra cepa de ratón utilizada en el estudio de la enfermedad es BALB/c, cuya principal característica es la generación de una respuesta de tipo Th2. Esta cepa susceptible a la enfermedad, no es capaz de controlar la enfermedad por inhabilidad para detener el crecimiento del parásito en el interior de la célula infectada. La susceptibilidad en estos ratones está asociada a la síntesis temprana de IL4, lo que se traduce en una polarización hacia una respuesta Th2. Esta expresión temprana de IL4 no ha sido detectada en los ratones C57BL/6 por lo tanto, es considerada como el primer factor en la susceptibilidad (Cortés, 2011).

Entonces, las diferencias entre resistencia y susceptibilidad en los ratones pueden estar asociadas a varios factores, uno de ellos es que cepas resistentes como los C57BL/6, J6 y CBA producen citoquinas que activan los macrófagos por la vía clásica para facilitar la muerte del parásito. En contraste, las cepas susceptibles (BALB/c) producen una respuesta tipo Th2 caracterizada por la producción de altos niveles de IL4, IL13 e IL10 las cuales activan el macrófago por la vía alterna e incrementan la producción de poliaminas favoreciendo el crecimiento y la proliferación del parásito. Se han encontrado que en los ratones BALB/c el parásito se disemina desde el lugar de

inoculación hasta el bazo e hígado, mientras que en los ratones resistentes el parásito es contenido en la almohadilla plantar y el ganglio de drenaje (Cortés, 2011).

Retinoides.

Los retinoides son compuestos pleiotrópicos derivados de la vitamina A que se han revelado muy importantes para numerosos procesos biológicos tales como: la inmunomodulación, la quimioprevención del cáncer, el melanotropismo, la estimulación del crecimiento, el mantenimiento y la diferenciación epitelial, la morfogénesis, la actividad antiinflamatoria y sebólica, el antagonismo de los corticosteroides, la síntesis de la matriz dérmica y la estimulación de la angiogénesis, el mantenimiento de las funciones visuales y en la reproducción (Allende, 1997).

El retinol, o vitamina A, es un alcohol primario insaturado de bajo peso molecular (286.46 Da) y de fórmula empírica $C_{20}H_{30}O$ (Tornero, 2004).

El reino vegetal es muy rico en precursores de la vitamina A, como son los carotenos, que en el intestino delgado pueden transformarse en retinol según las necesidades del organismo (Montis, 1987).

La Vitamina A es un isoprenoide insaturado, liposoluble, que se encuentra de forma natural en los tejidos animales. Sus niveles normales en sangre oscilan entre 0.35 y 0.75 mg/L (Fernández y Armario, 2003).

Pertenece a una familia de moléculas con estructura similar que se denominan de modo genérico retinoides. La actividad de la vitamina A en los mamíferos se debe no sólo a los retinoides, sino también a ciertos carotenos ampliamente distribuidos en la mayoría de los vegetales. Los carotenos no poseen actividad intrínseca de vitamina A por sí mismos, pero son convertidos en vitamina A mediante reacciones enzimáticas

que tienen lugar en la mucosa intestinal y en el hígado: así el β -caroteno, cuya molécula es simétrica, se escinde por su centro y rinde dos moléculas de retinol (Allende, 1997).

Isotretinoína (ácido-13-cis-retinoico), tretinoína, ácido retinoico, ácido-todo-trans-retinoico o vitamina A ácida: son metabolitos del retinol. Son moléculas inestables y vulnerables a la oxidación, al calor y a las radiaciones ultravioletas, lo que va a repercutir en su actividad terapéutica por ello se debe mantener lejos de la luz y a bajas temperaturas (Fernández y Armario, 2003).

Metabolismo de los Retinoides.

Los seres humanos requieren cantidades pequeñas de vitamina A en su dieta (400 a 1300 μg de retinol por día, según la edad). Esta cantidad se puede ingerir fácilmente en la alimentación diaria en la mayoría de los países occidentales, pero se ha demostrado que una dieta deficitaria de vitamina A (especialmente en niños) es un problema de salud común en algunas partes del mundo, dando como resultado xeroftalmia y un incremento de infecciones severas y muerte (Allende, 1997).

Los carotenos, son absorbidos como tales a nivel intestinal y son escindidos a retinal en los enterocitos, el retinal se une a una proteína intestinal (CRBP_{II}), la cual le protege de su oxidación a ácido retinoico y permite la reducción del retinal al retinol. Por otra parte, los ésteres de retinol (ER) sufren una hidrólisis en el lumen intestinal transformándose en retinol, de esta forma son absorbidos por los enterocitos y se unen a CRBP_{II}. En los enterocitos el complejo retinol-CRBP_{II} reacciona con ácidos grasos de cadena larga formando los ésteres de retinol. Los ésteres de retinol formados junto con los triglicéridos y los ésteres de colesterol son incorporados en los quilomicrones que son las principales lipoproteínas intestinales (Soria y Ribera, 2005).

Hipótesis

Los retinoides pueden tener efecto antiparasitario a través de su función en la modulación de la respuesta inmunitaria minimizando la lesión cutánea causada por *Leishmania (Leishmania) mexicana*.

Operacionalización de Variables

Variables Dependientes:

- Presencia de restos antigénicos de *Leishmania (Leishmania) mexicana*.
- Histopatología cutánea

Variables Independientes:

- Tratamiento con el ácido 13-cis retinoico (isotretinoína)
- Tratamiento con Vitamina A
- Tratamiento con β -caroteno

Tabla III. Operacionalización de la variable dependiente

<i>Operacionalización de la variable dependiente</i>					
Variables	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicador
Presencia de Restos Antigénicos	Dependiente Discreta	Resto antigénico se define como presencia del parásito o sus antígenos en los tejidos a estudiar	Se estudiará a través de la técnica Inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa indirecta)	Presente Ausente	Presente: depósitos del AEC (color marrón) Ausente: incoloro
Histopatología cutánea	Dependiente Discreta	Características presentes en los tejidos cutáneos cuando hay una patología	A través del contraste con hematoxilina de Gomori	Presente Ausente	Cambios histológicos asociados a la presencia o ausencia de restos antigénicos

Jaimes, D (2019)

Tabla IV. Operacionalización de las variables Independientes.

<i>Operacionalización de las variables Independientes.</i>					
Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicador
Tratamiento con Retinoides	Independiente Continua	Retinoides Es un fármaco antiinflamatorio	Los fármacos (ácido-13-cis-retinoico; Vitamina A y β -caroteno) se administrarán de 1 μ M/kg de peso/día durante 15 y 30 días continuos por vía oral	Preventiva	Preventiva previo a la infección

Jaimes, D (2019).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación.

La investigación es de tipo analítica mediante la evaluación del efecto antileishmanial del tratamiento preventivo con retinoides en ratones BALB/c//BIO infectados experimentalmente, desde febrero de 2016 hasta julio de 2018.

Diseño de la investigación.

El estudio propuesto se adecuó a los propósitos de la investigación de diseño univariante multicategórico, de laboratorio, contemporáneo e innovador. En función de los objetivos obtenidos definidos en el presente estudio donde se planteó: evaluar el efecto antileishmanial del tratamiento preventivo con retinoides en ratones BALB/c//BIO infectados experimentalmente.

Ubicado dentro de esta modalidad se emplearon técnicas de recolección de información, cumpliendo con varias etapas, la primera referida a la delimitación del objeto de estudio, logrado gracias a la realización del enunciado holopráxico, la segunda etapa implicó la recolección de información propiamente para la elaboración del marco teórico.

Población y Muestra.

En este proyecto de investigación, se realizó un estudio prospectivo con ratones hembras, singénicos, de la cepa BALB/c//BIO, de 8 semanas de edad, obtenidos del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes (BIOULA), manipulados siguiendo el protocolo de manejo de animales experimentales, planteado por el Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología (Venezuela) y distribuidos en los siguientes grupos de estudio: 1) Ratones sanos (A1); 2) Ratones infectados con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana* (A2); 3) Ratones sanos tratados con el agonista selectivo sintético ácido 13-cis-retinoico (isotretinoína) por 15 días continuos (A3); y 4) ratones tratados preventivamente durante 15 días continuos con el agonista selectivo sintético ácido 13-cis-retinoico e infectados al siguiente día con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana*; 4.1) ratones tratados preventivamente durante 15 días continuos con el agonista selectivo sintético ácido 13-cis-retinoico e infectados a los 8 días postratamiento con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana* 5) Ratones tratados preventivamente durante 15 días continuos con vitamina A e infectados al siguiente día con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana*; 5.1) ratones tratados preventivamente durante 15 días continuos con vitamina A e infectados a los 8 días postratamiento con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana*; 6) Ratones tratados preventivamente durante 15 días continuos con β -caroteno e infectados al siguiente día con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana* y 6.1) Ratones tratados preventivamente durante 15 días continuos con β -caroteno e infectados a los 8 días postratamiento con amastigotes del aislado M/HOM/VE/72/AZV de *Leishmania (Leishmania) mexicana*.

Tabla V. Población y Muestra

Grupos	n	Tratamiento		Infección	
		Retinoide	Dosis	Cepa	Densidad parasitaria
		IT Vit A B-C	1µmol/Kg de peso/día	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> M/HOM/VE/ 72/AZV	4x10 ⁵ promastigotes
Controles	A1	2	Sanos sin tratamiento	Sanos sin infección Infectados el día 1 Sanos sin infección	
	A2	2	Sin tratamiento		
	A3	2	15 días continuos con IT a partir del día 1		
		2			
Experimentales	B1	2	15 días continuos con IT a partir del día 1	El 1er día después de finalizado el Tratamiento	
	B2	2	15 días continuos con IT a partir del día 1	El 8vo día después de finalizado el Tratamiento	
	B3	2	15 días continuos con IT a partir del día 1	El 1er día después de finalizado el tratamiento	
	B4	2	15 días continuos con IT a partir del día 1	El 8vo día después de finalizado el tratamiento	
	B5	2	15 días continuos con IT a partir del día 1	El 1er día después de finalizado el tratamiento	
	B6	2	15 días continuos con IT a partir del día 1	El 8vo día después de finalizado el tratamiento	
			15 días continuos con IT a partir del día 1		

Unidad de Investigación.

Está representada por los ratones BALB/c//BIO infectados experimentalmente con *Leishmania (Leishmania) mexicana*.

Selección del tamaño muestral.

Los ratones fueron seleccionados a través de un muestreo no probabilístico y se utilizaron un total de 18 ratones BALB/c//BIO y 2 hámster de la especie *Mesocricetus auratus* machos de 8 semanas de edad; ambas especies obtenidos en el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes (BIOULA).

La estimación poblacional fue de 2 animales por grupo, basado en experimentos preliminares ya desarrollados, y considerando la dificultad de trabajar con un número de muestra más grande, por la factibilidad desde el punto de vista del tiempo y la economía del trabajo experimental.

Instrumento de recolección de datos.

En la investigación los datos fueron recolectados analizando las alteraciones histopatológicas mediante análisis descriptivo, sin realizar evaluación estadística

Procedimiento o Metodología de la investigación.

Modelos de inducción.

Se realizó un estudio prospectivo en un total de 18 ratones hembras, singénicos, de la cepa BALB/c//BIO, libres de patógenos específicos, de 8 semanas de edad, con un peso promedio de 18 ± 2 g, obtenidos del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes (BIOULA), y su manejo fue llevado a cabo bajo las mismas condiciones microambientales, macroambientales (24-28 °C de temperatura y 70-80% de humedad), alimentados con ratarina y agua estéril ad libitum.

La dosis empleada en cada uno de los tratamientos tuvo como base los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*. Se administró 1 $\mu\text{mol/Kg/día}$ de ácido 13-*cis*

retinoico (isotretinoína), vitamina A y β -caroteno según como le correspondían a los grupos experimentales. Los fármacos se diluyeron en ácido oleico debido a la característica lipofílica de estos, y se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente protegidos de la luz para evitar la degradación del componente activo.

Preparación de los fármacos a administrar.

Cada tratamiento se administró por vía oral, una vez al día a la misma hora, durante 15 días continuos según corresponda para los grupos de estudio, tomando el volumen del fármaco correspondiente a la dosis equivalente por el peso del animal, se utilizó una pipeta con una punta estéril por cada animal, introduciéndola hasta la parte media de la boca del ratón por encima de la lengua, descargando el volumen lentamente mientras el animal succionaba.

Aislamiento de amastigotes y obtención de los promastigotes de Leishmania (Leishmania) mexicana para los ensayos de evaluación del efecto anti-leishmanial.

Los amastigotes fueron obtenidos a partir de macerado de la lesión cutánea de hámster dorado machos (*Mesocricetus auratus*) infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, posteriormente sacrificado el animal mediante el método de inhalación con éter y con previa rigurosa asepsia y antisepsia se obtuvo dentro de una campana de flujo laminar la biopsia de la pata del hámster con la ayuda de pinzas cortantes especiales de 4 mm (Cutting Biopsy Punch), retirando un número variable de fragmentos de tejido en la dependencia de la extensión del granuloma y de su accesibilidad. Las biopsias fueron trituradas en 2 ml de solución salina estéril utilizando un mortero estéril de 15 ml con una rejilla metálica, con la finalidad de liberar de manera mecánica los amastigotes tanto extracelulares como intracelulares. Para eliminar los restos celulares de la suspensión de amastigotes se centrifugó el macerado de la lesión en 10ml de solución salina estéril a 2000 g a 25 °C durante 10 minutos, resuspendiendo el sedimento en 1 ml de solución salina estéril.

La muestra homogenizada se observó al microscopio óptico para verificar la presencia de parásitos. El volumen total del homogenizado (1 ml) se incubó en el medio bifásico agar sangre-NNN (medio de Novy, McNeal, Nicolle) que constituye el medio empleado más conocido para el cultivo de parásitos hemáticos y tisulares. Al desarrollarse los promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, se repicaron en el medio líquido LIT (infusión de hígado y triptosa) con 10% de suero fetal bovino inactivado, manteniendo los cultivos *in vitro* axénicamente por un periodo de 5 a 7 días, a 26 °C hasta alcanzar una absorbancia entre 0,7 y 0,9, que fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda λ_{abs} de 560 nm; lo que representa el final de la fase logarítmica exponencial y comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. En este punto de la curva de crecimiento, la densidad parasitaria en el cultivo *in vitro*, varía entre 10^7 y 10^8 promastigotes/ml, característica importante para la mayor eficiencia de la infectividad de las cepas de *Leishmania sp.*

Infección experimental de los modelos múridos con promastigotes de Leishmania (Leishmania) mexicana.

Con la finalidad de analizar si la actividad anti-leishmanial evidenciada *in vitro* por los retinoides se conserva en el modelo múrido de susceptibilidad a la leishmaniasis, se desarrollaron ensayos *in vivo* infectando los animales experimentalmente con la especie *Leishmania (Leishmania) mexicana*, una de las principales especies responsable de la presentación cutánea de la enfermedad en Latinoamérica.

Los promastigotes se obtuvieron a partir de cultivos de parásitos en fase estacionaria a una absorbancia entre 0,6 y 0,7 a λ_{abs} de 560 nm. El cultivo se lavó en solución salina estéril centrifugando a 2000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, los promastigotes se contaron en un hemocitómetro, se diluyó la

suspensión de parásitos en solución salina estéril hasta obtener 2×10^6 parásitos/ml, se inoculó el equivalente a 4×10^5 parásitos/0,2 ml de solución salina estéril por vía subcutánea, con una jeringa de 1 ml con aguja de 25Gx $\frac{1}{2}$ ", en la parte dorsal de la pata posterior derecha de los ratones hembras BALB/c//BIO según el esquema de infección descrito, representado por ratones infectados posterior al tratamiento.

Obtención de la lesión y preparación de los tejidos para histología.

Luego de transcurridas 8 semanas de la infección experimental cutánea, los ratones fueron sacrificados por inhalación de éter. Las patas con lesión activa y las patas contralaterales sanas; ya sean provenientes de ratones infectados y tratados o no con ácido 13-cis-retinoico(isotretinoína), vitamina A o β -caroteno, fueron seccionadas tangencialmente e incluidas en el componente OCT (Optimal Cutting Temperature) (Tissue Tek; Miles, Inc. Diagnostic, Kankakee, IL, USA) y almacenadas a -80°C hasta la que se realizó de los cortes histológicos. Para el estudio histopatológico se procedió a realizar cortes seriados de los tejidos congelados a un espesor de 4 a 5 μm a -24°C usando un criostato (Leica CM1900-3-1), colocando los cortes seriados en láminas portaobjetos previamente cubiertas con 0,005 % de poly-L-lysine hydro- bromide.

Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se fijaron en acetona durante 10 minutos y finalmente se almacenaron envueltos cuidadosamente en papel parafilm a -80°C , hasta la realización de los estudios histopatológicos.

Detección de antígenos de Leishmania (Leishmania) mexicana y estudio histopatológico de los tejidos de piel.

La detección de amastigotes y antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* fue realizada mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Para ello, dichas secciones de tejidos se incubaron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3 % en metanol

por 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Luego fueron lavadas 2 veces con PBS a Ph=7,2 durante 10 minutos cada lavado e incubadas con suero normal de cabra al 30 % en PBS por 20 minutos. Posteriormente, se incubaron por 30 minutos en cámara húmeda con suero *anti-Leishmania (Leishmania) mexicana* producido en conejo diluido 1:50 en PBS/Tritón al 0,1%, se lavó con PBS a Ph=7,2 por 5 minutos para ser incubadas con anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa (HRP) diluido 1:500 en PBS durante 30 minutos. Las secciones de tejido se lavaron con PBS durante 5 minutos y se incubaron en cámara húmeda con solución cromógena 3, 9 amino-ethyl-carbazole (AEC) junto a 0.03 % de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en 0,01 M de solución amortiguadora de acetato a Ph=5.0 por 10 minutos.

Seguidamente fueron contra coloreadas con Hematoxilina de Gomorí y finalmente montadas con glicerina tamponada en PBS (9:1) para ser observadas al microscopio óptico (Leica DMLS, Shanghai, China) con objetivo de 40X de aumento. En cada experimento se realizó en paralelo controles de interacción inespecífica del anticuerpo anti-IgG y de bloqueo de la actividad de la peroxidasa.

Diseño de análisis. Según varios autores, los datos se pueden analizar por medios de enfoques cuantitativos o cualitativos (Hurtado, 2010; Palella y Martins, 2010). En nuestro caso, los datos obtenidos se analizaron cualitativamente, mediante análisis descriptivo, donde se caracterizó la presencia de amastigotes y se evaluó las alteraciones típicas del tejido asociadas a la infección.

**Diseño
Experimental**

**Administración de
Fármacos**

→ Vía oral durante 15 días

**Aislamiento de amastigotes
y**

→ Los amastigotes fueron
obtenidos a partir de la lesión
cutánea luego las biopsias
fueron trituradas y cultivadas
para obtenerlos promastigotes

Obtención de los promastigotes

Infección experimental

→ vía subcutánea en la parte
dorsal de la pata posterior
derecha

**Obtención de la lesión y
preparación de los tejidos para
histología**

→ Los ratones fueron
sacrificados, las patas con
lesión activa y las patas
contralaterales sanas fueron
seccionadas tangencialmente e
Incluidas en el componente
OCT

Detección de antígenos

→ Técnica de inmunoperoxidasa
indirecta

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Teniendo en cuenta que la dosis óptima recomendada para la administración de retinoides necesaria para la ocupación del 100% de los receptores de retinoides en el organismo corresponde a 1 μmol por Kg de peso al día (1 M) para la isotretinoína y 10.000 UI al día equivalentes a 10 μmol al día (10 M) para la vitamina A, se procedió a evaluar la inhibición del proceso inflamatorio *in vivo* evidenciada en cambios histopatológicos.

1) Eficacia terapéutica de β -caroteno, vitamina A e isotretinoína en la clínica de leishmaniasis cutánea. La eficacia de estos retinoides se evaluó utilizando el modelo experimental BALB/c//BIO susceptible a la leishmaniasis. Para ello, se consideraron los cambios histopatológicos cutáneos con el objeto de determinar la evolución de la lesión asociado a la mejoría clínica. De esta forma, se probaron los compuestos administrándolos de manera preventiva por vía oral a la dosis recomendada farmacológicamente.

1.1) Cambios histopatológicos cutáneos. Como se mencionó en la sección de metodología, posterior al sacrificio de los animales se realizaron las biopsias de piel para llevar a cabo el estudio histopatológico mediante tinción con hematoxilina de Gomori, a través de la visualización directa por microscopía de luz.

Las características histopatológicas de la leishmaniasis cutánea localizada causadas por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, se registraron de acuerdo al grupo de estudio. En general, se acepta que la leishmaniasis cutánea es polimórfica en su

presentación y evolución clínica, probablemente debido a la variabilidad en la virulencia del parásito, al fondo genético del hospedador y a la respuesta inmunitaria, por lo que las diferencias histopatológicas y su correlación con la inmunopatogénesis de la enfermedad y la virulencia de *Leishmania (Leishmania) mexicana* la describo de la siguiente manera:

1.1.1) Controles sanos. Histológicamente la piel de los ratones sanos (A1) se observó sin alteraciones en la capa epidérmica ni en el tejido conjuntivo subyacente dérmico, el cual estaba libre de células inflamatorias y sin proyecciones por encima de la membrana basal hacia el estrato epidérmico. Mientras que, para los animales del grupo control sanos tratados con isotretinoína (A3) también se observó que todo el tejido mantuvo conservada su arquitectura, pero mostró dilatación de los vasos sanguíneos y linfáticos sin extravasación celular. Representados en la Figura II como A1 y A3 respectivamente.

1.1.2) Controles infectados. Diversos cambios epidérmicos pueden observarse en las lesiones cutáneas de leishmaniasis activa; así la piel de ratones infectados (A2) mostró en la epidermis hiperqueratosis difusa y acantosis, infiltrado predominantemente macrofágico vacuolados con parásitos por debajo del epitelio, y en dermis profunda histiocitos, linfocitos y diversos plasmocitos. Representados en la Figura II como A2 respectivamente.

1.1.3) Tratamiento preventivo con β -caroteno. En el estudio histológico de este grupo experimental de ratones infectados al día siguiente (B5) o a la semana siguiente (B6) de finalizado el tratamiento con β -caroteno, los tejidos cutáneos presentaron en su epidermis hiperqueratosis difusa y acantosis, presentándose por debajo de la epidermis macrófagos activados (vacuolados) con parásitos en su citoplasma y restos antigénicos, mientras que en la dermis profunda se identificó un infiltrado celular denso y difuso con predominio mononuclear y presencia de células plasmáticas e histiocitos con estructuras puntiformes basofílicas en su citoplasma, compatible con parásitos, que formaron granulomas epiteloideos desorganizados. Representados en la Figura III como B5 y B6 respectivamente.

1.1.4) Tratamiento preventivo con vitamina A. cuando se analizó los cortes de piel de los ratones tratados durante quince días con vitamina A y posteriormente infectados al día siguiente (B3) y a la semana siguiente (B4), se observó en la epidermis hiperqueratosis ortoqueratótica y acantosis, en el caso de la dermis un infiltrado dérmico con macrófagos activados (vacuolados) con parásitos en su citoplasma y restos antigénicos, generando atrofia dérmica; mientras que en la dermis profunda se identificó la presencia de células mononucleares y células plasmáticas. Representados en la Figura IV como B3 y B4 respectivamente.

1.1.5) Tratamiento preventivo con isotretinoína. El estudio histopatológico de los ratones tratados preventivamente con 1 μ M de isotretinoína (B1) determinó que los tejidos de los ratones infectados al día siguiente de finalizado el tratamiento, presentaron hiperqueratosis sin otras alteraciones epidérmicas; en la dermis un infiltrado difuso mononuclear, es decir, con presencia de histiocitos, células plasmáticas y linfocitos. Representados en la Figura 5 como B1. Por el contrario, los tejidos de los ratones infectados a los ocho días siguientes de finalizado el tratamiento con isotretinoína (B2) presentaron un escaso infiltrado inflamatorio dérmico con células desgranulando en presencia de abundantes fibroblastos con evidente fibrosis dérmica, consistente con un proceso de cicatrización y reparación de daño tisular asociado a procesos inflamatorios. Representados en la Figura V como B2.

1.2) Presencia de amastigotes y antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* en lesiones cutáneas de ratones tratados con retinoides. La detección de restos antigénicos en el tejido permitió determinar la actividad antiparasitaria de los retinoides administrados oralmente sobre la forma amastigote intracelular in vivo.

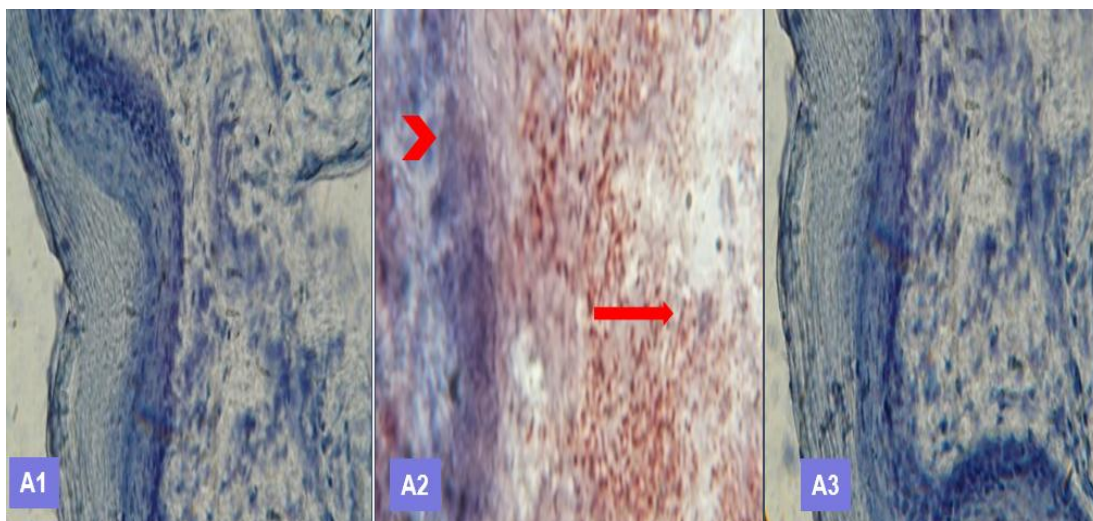
1.2.1) Ratones sanos. La técnica de inmunoperoxidasa indirecta realizada en muestras de piel de los ratones sanos (A1) demuestra ausencia de inmunoreactividad inespecífica al anticuerpo anti-*Leishmania*, ni actividad de peroxidasa intrínseca. En los tejidos de los ratones sanos tratados con isotretinoína (A3), la inmunoreactividad también fue negativa (Figura II; imagen A1 y A3).

1.2.2) Ratones infectados. Los tejidos obtenidos de los ratones del grupo control infectado con *Leishmania (Leishmania) mexicana* presentaron inmunoreactividad al

anticuerpo anti-*Leishmania*, observándose abundantes amastigotes dérmicos junto a una intensa reacción extracelular que indica la presencia de antígenos parasitarios, lo cual es compatible con leishmaniasis activa (Figura II; imagen A2).

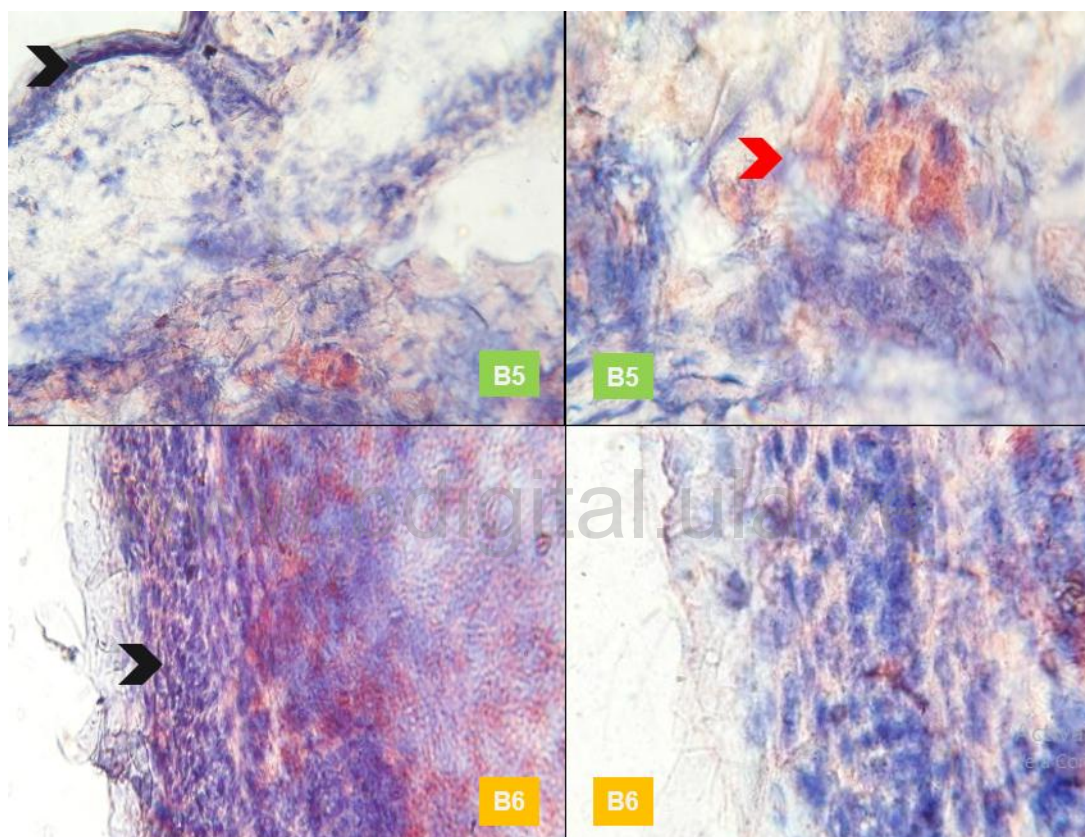
1.2.3) Tratamiento preventivo. Los animales tratados preventivamente con β -caroteno e infectados al día siguiente (B5) o a la semana siguiente (B6) de finalizado el tratamiento, a pesar de que mostraron una disminución en el tamaño de las lesiones de más del 50%, dicha mejoría no fue dependiente de la ausencia de antígenos del parásito, pues como se observa en las imágenes B5 y B6 de la Figura III, la reactividad antigénica estaba presente en toda la dermis e incluso a nivel de la epidermis descamativa. En los ratones tratados preventivamente con vitamina A e infectados al día siguiente (B3) o a la semana siguiente (B4) de finalizado el tratamiento, tampoco se evidenció que la carga parasitaria desapareciera, aun cuando las lesiones fueron destacadamente de menor tamaño que el control de infección (Figura II; imagen A1), la reactividad antigénica igualmente tenía una distribución a lo largo de toda la dermis (Figura IV; imagen B3 y B4). En los ratones que fueron tratados con isotretinoína e infectados al día siguiente (B1) también se observó presencia de antígenos parasitarios en zonas restringidas de la dermis profunda, precisamente por debajo del infiltrado inflamatorio. Por el contrario, de manera llamativa, se destaca que en los tejidos de ratones tratados preventivamente con isotretinoína e infectados una semana post-tratamiento (B2) no se evidenció presencia de antígenos o parásitos de *Leishmania*. (Figura V; imagen B2), siendo la reacción de inmunoperoxidasa anti-*Leishmania* similar a la observada en los controles sanos no infectados y sanos tratados.

Figura II. Histopatología de la piel de ratones sanos sin tratamiento (A1), infectados sin tratamiento (A2) y sanos tratados con isotretinoína por 15 días continuos (A3).



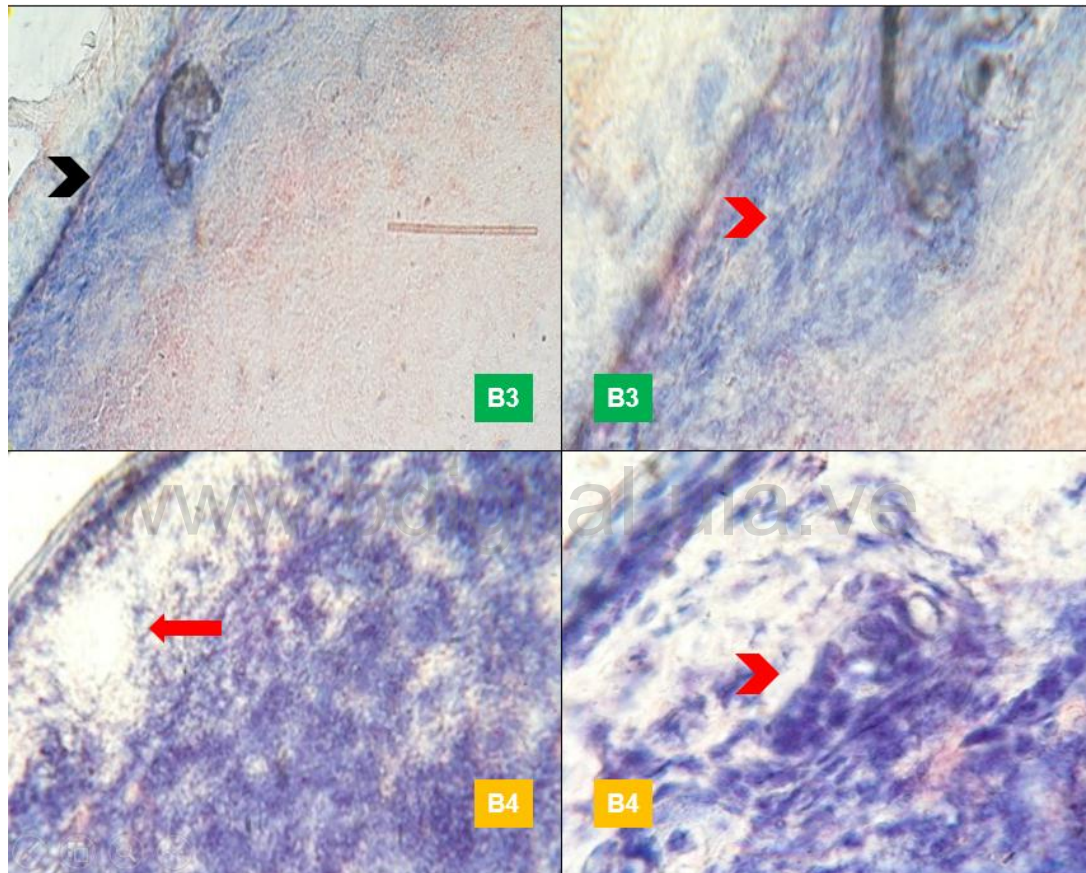
Nota. Hiperqueratosis difusa y acantosis (punta de flecha roja), debajo del epitelio macrófagos vacuolados con parásitos (flecha roja) y en dermis profunda histiocitos, linfocitos y diversos plasmocitos formando granulomas.

Figura III. Histopatología de tejidos cutáneos provenientes de ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con β -caroteno e infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana al siguiente día postratamiento (B5); y ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con β -caroteno e infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana al 8vo día postratamiento (B6).



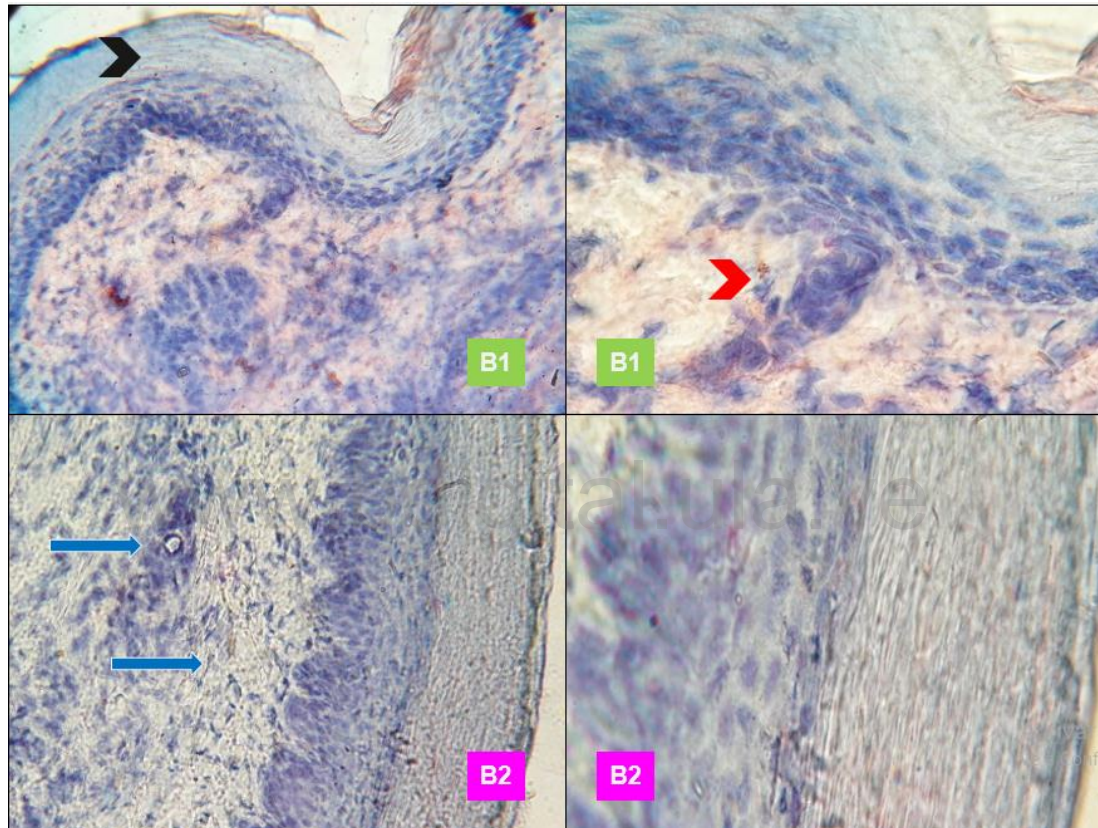
Nota. Hiperqueratosis (punta de flecha negra) en B5 y B6. Infiltrado difuso mononuclear formando granulomas (punta de flecha roja) en B5 y B6. Objetivo de 40x y 100x.

Figura IV. Histopatología de tejidos cutáneos provenientes de ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con vitamina A e infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana al siguiente día postratamiento (B3) y de ratones tratados preventivamente por 15 días continuos con vitamina A e infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana al 8vo día postratamiento (B4).



Nota. Hiperqueratosis ortoqueratótica (punta de flecha negra) en B3. Infiltrado difuso mononuclear formando granulomas (punta de flecha roja) en B3 y B4, Atrofia epidérmica (flecha roja) en B4. Objetivo de 40x y 100x

Figura V. Histopatología de tejidos cutáneos provenientes de ratones tratados preventivamente con isotretinoína por 15 días continuos e infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana al siguiente día postratamiento (B1) y ratones tratados preventivamente con isotretinoína por 15 días continuos e infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana al 8vo día postratamiento (B2).



Nota. Hiperqueratosis (punta de flecha negra). En dermis un Infiltrado difuso mononuclear formando granulomas (punta de flecha roja) en B1. Fibroblastos y fibrosis dérmica (flecha azul) en B2. Objetivo de 40x y100x.

Discusión

La leishmaniasis es una enfermedad cuya incidencia ha aumentado en los últimos años, hasta en un 500%, según la OMS, además consideran a esta enfermedad como una de las prioritarias en su Programa Especial de Investigación y Entrenamiento sobre Enfermedades Tropicales, de igual forma se clasificó en la categoría I de las enfermedades infecciosas, que son las que se encuentran en situación emergente incontrolada (WHO Report, 2008). La leishmaniasis cutánea, es la presentación clínica de una de las enfermedades parasitarias responsable de los más altos índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, razón por la cual en esta investigación se presentan esfuerzos centrados en el desarrollo de una estrategia encaminada a la implementación de una inmunoterapia que mejore los tratamientos existentes, promoviéndose de este modo una alternativa terapéutica eficaz, económica y más segura para la población afectada (Sánchez et al., 2004).

Existe una amplia variación en la respuesta a los diversos intentos terapéuticos. Se ha logrado el desarrollo de una inmunoterapia que apartir del año 1986 ha ido reemplazando progresivamente el tratamiento tradicional con antimoniales. En la actualidad más del 90% de los casos son tratados con inmunoterapia (Soto y Soto, 2006). En una investigación sobre inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea americana (LCA), con un estudio aleatorio en 94 pacientes en el que se comparó una vacuna que combina promastigotes de *Leishmania* muertos por autoclave con una suspensión de bacilos de Calmette-Guerin (BCG) vivo, con un régimen estándar de quimioterapia antimonial (meglumine antimoniato). Se administraron tres vacunas en un período de 32 semanas, y se obtuvieron resultados de curación similares (94%) al antimonial. Los efectos secundarios del grupo vacunado fueron escasos y discretos (5,8%), mientras que en el grupo tratado con quimioterapia fueron muy frecuentes (52,4%) y en algunos casos severos. Como resultado de esta experiencia inicial, concluyeron que la inmunoterapia era una alternativa de bajo riesgo y bajo costo, para el tratamiento de la LCA (Convit et al., 1996).

Hay que tener en cuenta que los fármacos con los que se cuenta en la actualidad para el control de la leishmaniasis presentan diversos inconvenientes como son: inducir la aparición de cepas de parásitos resistentes [*Leishmania (leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Viannia) panamensis*] a los medicamentos utilizados como tratamiento; poseer elevada toxicidad generando efectos secundarios adversos como reacciones de hipersensibilidad con erupciones cutáneas, náuseas y vómitos, cefaleas, dolor abdominal, fiebre, mialgias y artralgias. Otros más graves son las alteraciones electrocardiográficas, elevación de las transaminasas, pancreatitis y neuropatía periférica, debido a los esquemas prolongados y vías de administración, y ser de altos costos asociados (Domingo, 2004).

Tratando de aportar una solución que ayude a entender los mecanismos implicados en la resistencia o susceptibilidad natural a la infección cutánea por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, se hace relevante el diseño y desarrollo de intervenciones terapéuticas eficaces y seguras, que contemplen la inmunomodulación, con el objeto de potenciar y favorecer la actividad antiparasitaria de los componentes de la respuesta inmunitaria, promoviendo los mecanismos naturales de defensa del hospedero. Es allí donde las investigaciones realizadas en el modelo murino, permiten esclarecer los posibles mecanismos celulares implicados en el control de este patógeno intracelular, como una base importante de conocimiento para generar una respuesta inmunitaria protectora o que cause el menor daño tisular al individuo infectado.

Existen diferentes patrones de respuesta inmunitaria (Th1 y Th2), y su papel en el desarrollo de enfermedades es antagónico. La relación Th1/Th2 va a determinar el curso de la enfermedad. La activación de Th1 se relaciona con la resistencia a la infección (Reviákina y Panizo, 2001). En contraste, los ratones susceptibles (BALB/c), desarrollan una respuesta Th2 frente a la infección. Los linfocitos T CD4⁺ de los ratones BALB/c producen ARN mensajero (ARNm) de IL4 en respuesta al antígeno LACK de *Leishmania* (homólogo del receptor de la Kinasa C activada). IL4 regula

negativamente la expresión de IL12, citoquina importante en la inducción de la expansión de la respuesta Th1. En consecuencia se inhiben los mecanismos efectores dependientes de estas células y se favorece la expansión de los linfocitos Th2. La capacidad del sistema inmunitario de derivar hacia una respuesta tipo Th1 está mediada por la producción de IL12 (Cortés, 2011). El fallo en la producción de IL12 puede estar mediado por más de una señal, entre ellas la baja producción de IL4 por parte de la APC, lo que conlleva a que la respuesta inmunitaria se polarice hacia Th2. También se ha descrito que IL10 suprime la expresión de la IL12 desactivando la acción leishmanicida de los macrófagos (Cortés, 2011).

Con el fin de abordar dicha problemática, el propósito de la presente investigación se encaminó a evaluar la actividad anti-leishmanial y establecer la efectividad clínica preventiva, de los retinoides (β -caroteno, vitamina A e isotretinoína) en el modelo experimental mudo de susceptibilidad BALB/c//BIO, aportando de este modo información para un primer acercamiento de la actividad biológica terapéutica de estos compuestos en la leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana*.

Los retinoides al poseer propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras deben ser considerados en la terapia para leishmaniasis cutánea. Teniendo relación en la respuesta inmunitaria por parte de los modelos mudos generando un cambio de respuesta de tipo Th2 hacia Th1 debido a su capacidad de diferenciación celular, promoviendo así un mecanismo de defensa anti-leishmanial, lo que hace relevante la investigación de terapias eficaces y seguras para potenciar los componentes de la respuesta inmunitaria.

La leishmaniasis cutánea al ser una enfermedad endémica y al ser su tratamiento de primera línea los antimoniales, siendo estos de alta toxicidad y de altos costos, el propósito de la presente investigación se encaminó a la evaluación del efecto anti-leishmanial del tratamiento con retinoides en ratones BALB/c//BIO infectados

experimentalmente con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, para ello se aplicó tratamiento preventivo por 15 días continuos con β -caroteno, Vitamina A e Isotretinoína por vía oral, posteriormente inoculando a los modelos múridos un día o 8 días luego de finalizado el tratamiento, con *Leishmania (Leishmania) mexicana* por vía subcutánea, seguidamente del estudio histopatológico a través la técnica de inmunoperoxidasa indirecta y así detectar la presencia de amastigotes y antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, para finalmente efectuar la coloración por contraste con Hematoxilina de Gomori para observar la patología de los tejidos cutáneos. Considerando, entonces, a los retinoides como posible tratamiento para lesiones tisulares causadas por *Leishmania (Leishmania) mexicana* debido a su capacidad de inmunoregular un amplio espectro de sistemas biológicos, particularmente el sistema inmunitario a nivel cutáneo.

Debido a la ausencia de reportes previos sobre la evaluación de la actividad inmunomoduladora *in vivo* de los retinoides sobre *Leishmania (Leishmania) mexicana*, en el presente estudio se obtienen resultados inéditos donde se revela que los retinoides no presentan un efecto anti-leishmanial, excepto cuando se indujo la infección una semana después del tratamiento preventivo con isotretinoína, donde histológicamente no se presenciaron parásitos ni sus antígenos en el tejido, lo que conlleva a concluir que la isotretinoína puede afectar la respuesta inmunitaria innata previniendo el desarrollo de la enfermedad.

Los carotenos conocidos también como provitamina A están ampliamente distribuidos en la mayoría de los vegetales y son convertidos en vitamina A mediante reacciones enzimáticas que tienen lugar en la mucosa intestinal y en el hígado: así el β -caroteno se escinde por su centro y rinde dos moléculas de retinol luego a través de un proceso metabólico se genera su principal metabolito el ácido retinoico y uno de sus esteroisómeros el ácido 13-*cis* retinoico o isotretinoína (13cAR) constituyentes normales del suero necesario para distintas funciones biológicas (Allende, 1997). Por lo tanto, se sugiere que aunque los carotenos (vitamina A y el β -caroteno)

metabólicamente darán origen a retinoides biológicamente activos como antiinflamatorios, no se administró durante tiempo suficiente o a concentración apropiada, para que luego de su metabolismo se alcanzara una concentración biológicamente activa de retinoides que ocupen el 100% de los receptores.

Con referencia a los resultados clínico-histopatológico, en este trabajo se encontró que los datos relacionados con presencia de abundantes amastigotes se relacionaba positivamente con el tamaño de la lesión, pudiéndose interpretar que el tiempo de evolución y tamaño de la lesión era dependiente del tiempo en el que se administró el retinoide, siendo la terapia preventiva con isotretinoína la que retardaba efectivamente la parasitosis y que a su vez se correlacionaba con la ausencia de cambios histopatológicos y necrosis tisular.

Aportando de este modo información para un primer acercamiento de la actividad biológica terapéutica de estos compuestos en la leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana*. Es bien sabido que la única función reconocida por los carotenoides es la capacidad de convertirse en retinol (función provitamínica-A). Estos incluyen una gran familia de moléculas solubles en grasa destacadas por su acción antioxidante. Sin embargo, además de su efecto antioxidante, también ejercen un efecto antiinflamatorio, desempeñando un papel importante en la prevención de complicaciones cardiovasculares (Ucci et al., 2019). Durante los últimos años, las pruebas epidemiológicas apoyan un efecto protector de los carotenoides. La suposición de que nutrientes antioxidantes (β -caroteno) pueden ejercer función preventiva frente al cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular senil, se basa en pruebas experimentales que sugieren que estos compuestos funcionan como antioxidantes, moduladores de la respuesta inmunitaria, y modificadores de procesos inflamatorios (Begoña, Granado y Blanco, 2001). Otros estudios han reportado que su relación es más eficiente en la protección del riesgo de cáncer en piel como consecuencia de la radiación ultravioleta (UV). Actuando como agente fotoprotector que bloquea las reacciones fotoquímicas en la epidermis las cuales involucran al

oxígeno y a radicales de oxígeno generados por la exposición a la radiación UV (Carranco, Calvo y Pérez, 2011).

Los mecanismos por los cuales los carotenoides regulan la respuesta inmunitaria en gran medida no están claros, a pesar de ello se ha informado que β -caroteno y otros carotenoides poseen actividades inmunomoduladoras en humanos y animales. Estos carotenoides mejoran la blastogénesis de los linfocitos, aumentan la población de subconjuntos de linfocitos específicos, aumentan la actividad citotóxica de los linfocitos y estimulan la producción de diversas citoquinas, por esto, la acción inmunoestimuladora de los carotenoides puede traducirse en una mejor salud (Chew, 1993).

La erupción polimorfa lumínica es la más común de las fotodermatosis, en los países no tropicales se caracteriza por la presencia de pápulas eritematosas, pruriginosas, así como vesículas, placas, o lesiones que semejan piquetes de insecto o del tipo de eritema multiforme. Histológicamente existen cambios que incluyen acantosis, paraqueratosis, edema de la dermis papilar, acompañado en las lesiones tempranas de un infiltrado linfocitario de predominio perivascular superficial, y en las lesiones tardías, el infiltrado también se dispone en la dermis profunda (Saeb, Cortés, Vega, Hojyo, Guevara y Domínguez, 1999). Resultando similar al presente estudio donde se manifiesta hiperplasia pseudoepiteliomatosa e infiltrado inflamatorio denso y difuso en epidermis y dermis formando granulomas epiteloideos (células polimorfonucleares), para lo cual se han intentado tratamientos con respuesta variable, entre estos el β -caroteno (Saeb et al., 1999) el cual presenta diversas controversias, pero a pesar de esto (Cui, Su, Qibo, Xiaojun, 2012) mostraron que el tratamiento con β -caroteno puede mejorar la función inmunitaria. Además, estudios epidemiológicos sugieren que el β -caroteno puede modular el riesgo de cáncer. Varios estudios informaron que el β -caroteno inhibe el crecimiento de las células cancerosas por inducción de apoptosis en células en proliferación (Briviba, Schnäbele, Schwertle, Blockhaus, y Rechkemmer, 2001).

Conociendo que los retinoides han adquirido la condición de fármaco indispensable debido a la observación de resultados efectivos en un alto número de procesos cutáneos y por las innovaciones que se han realizado tanto en su estructura como en su formulación. En la actualidad su efectividad y seguridad está bien establecida, tanto en formulaciones tópicas como sistémicas, en acné, psoriasis y fotoenvejecimiento. En los últimos años se han descrito nuevas indicaciones de los retinoides en dermatología entre las que caben destacar su uso en el tratamiento del cáncer cutáneo, cuyo espectro de acción se explica por la diversidad biológica de actividades farmacológicas que tienen los retinoides. Estas acciones incluyen la inmunomodulación, la quimioprevención del cáncer, el melanotropismo, la estimulación del crecimiento, el mantenimiento y la diferenciación epitelial, la morfogénesis, la actividad antiinflamatoria y sebolítica, el antagonismo de los corticosteroides, la síntesis de la matriz dérmica y la estimulación de la angiogénesis. De esta manera, los retinoides tienen indicación en múltiples procesos dermatológicos entre los que procede destacar el acné, la psoriasis, las cicatrices hipertróficas, la rosácea, las alteraciones crónicas hiperqueratóticas, las alteraciones de la queratinización de las mucosas, las neoplasias incluyendo los linfomas cutáneos (Fernández y Armario, 2003).

La isotretinoína es un retinoide sintético considerado como la única terapia que produce una tasa de curación del 70% y afecta los cuatro factores patogénicos involucrados en el acné: reduce la producción de sebo, el tamaño de la glándula sebácea en un 90%, inhibe la diferenciación terminal del sebocito y tiene acción antiinflamatoria. Tiene la capacidad de aumentar la mitosis de las células epidérmicas y su recambio, produciendo una capa de células corneas menos cohesiva que se descama con mayor facilidad (acción queratolítica). Por estas razones la isotretinoína ha sido de preferencia entre uno de los fármacos a administrar en el presente estudio.

Sorprendentemente el uso de retinoides *in vivo* no fue anti-leishmanial en este modelo experimental, a excepción del caso cuando se indujo la infección una semana

después de finalizado el tratamiento preventivo con isotretinoína, donde histológicamente no se evidenció presencia de parásitos ni sus antígenos en el tejido. Pero tomando en conjunto los resultados clínicos, se demuestra que la isotretinoína, la vitamina A y el β -caroteno tienen un efecto que aunque no es antiparasitario, si previene el desarrollo de la enfermedad, lo que implica que estos compuestos afectan principalmente la respuesta inmunitaria innata, la cual se ve potenciada particularmente en los animales tratados preventivamente con isotretinoína, lo que sugiere que la capacidad de los retinoides para inducir la fortificación de la respuesta innata del hospedador tratado preventivamente constituye una forma importante de prevenir el desarrollo de la leishmaniasis cutánea y probablemente otras enfermedades severas. Así, en el caso de los tejidos tratados con isotretinoína de manera preventiva se evidenciaron cambios leves en la arquitectura del tejido infectado, los cuales se asociaron claramente con la presencia de células cebadas, conocidas como promotoras de procesos de cicatrización tisular, relacionándose su presencia con el restablecimiento favorable de la morfología tisular, y la restricción del crecimiento del agente patógeno en la zona de inoculación, evento relacionado a nivel macroscópico también con la ausencia clínica de lesión.

Los retinoides luego de ser ingeridos se metabolizan a nivel del intestino delgado transformándose intracelularmente, se unen a receptores nucleares (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR) (Allende, 1997). Los RAR se expresan casi exclusivamente a nivel cutáneo y son capaces de reconocer a todos los isómeros naturales del ácido retinoico. Existen 3 isoformas: RAR- α (exclusivo de la capa germinativa de la epidermis y relacionado con la proliferación de queratinocitos), RAR- β (inducido por el ácido retinoico) y RAR- γ (se expresa en epidermis y se relaciona con la diferenciación de queratinocitos). Los RXR también tienen 3 isoformas (alfa, beta y gamma) estos pueden unirse activamente a elementos de respuesta de ácido retinoico (RAREs) y estos complejos transactivarían más eficazmente los promotores inducibles que los homodímeros de esos receptores que finalmente actúan sobre dianas genómicas de elementos de respuesta de retinoides

involucrados en la respuesta inmunitaria, lo que le otorga a los retinoides la capacidad de constituirse como un profármaco inmunoterapéutico particularmente de la respuesta innata (Allende, 1997).

Para entender estos resultados inéditos, es importante recordar que los retinoides tienen actividad intracrina porque su transformación es intracelular y su función biológica es ejercida cuando se activan sus receptores nucleares específicos, como son los receptores de ácido retinoico y los receptores X de retinoides, que finalmente actúan sobre dianas genómicas de elementos de respuesta de retinoides (Crowe y Chandraratna, 2004). A diferencia de otros productos químicos naturales actualmente en estudio, los retinoides han sido ampliamente probados en humanos. Más de 30 años de investigación clínica intensiva con el objetivo de aprovechar los potentes efectos anticancerígenos de los retinoides.

Diversas enfermedades dermatológicas infecciosas, inflamatorias y autoinmunes como acné, rosácea, psoriasis, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico (LES), micosis fungoide, candidiasis, piodermias, virosis cutáneas, cáncer, por mencionar algunas, han establecido claramente que influyen y activan receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) como son los receptores Toll (TLR) para inducir la respuesta inmunitaria innata; entonces, siendo las células cutáneas, la primera barrera de defensa que favorece la respuesta inmunitaria innata, a través de la expresión de receptores Toll, su regulación con los receptores para retinoides, abre el camino para el desarrollo de nuevas líneas terapéuticas que permitan que a través de los retinoides, se activen cascadas de señalización, incluyendo la del factor nuclear (NFkB), para inducir la producción de citoquinas, quimioquinas, péptidos antimicrobianos y aumento en la expresión de las moléculas de adhesión, todos elementos funcionales que potencian la respuesta innata y adaptativa anti-*Leishmania* (Martínez, Berzunza, y Becker, 2008).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.

Basado en los resultados inéditos aportados en la presente investigación, los retinoides no tienen un efecto anti-leishmanial excepto cuando se indujo la infección una semana después del tratamiento preventivo con isotretinoína, lo que sugiere que la isotretinoína pudiera ser potenciadora de la respuesta inmunitaria innata favoreciendo la actividad antiparasitaria. Siendo, entonces la isotretinoína, un retinoide con opción para la terapia eficaz, económica y segura de la población afectada, por lesiones tisulares causadas por *Leishmania sp.*

Recomendaciones

1. Debido a la poca disponibilidad de trabajos previos sobre el evento de estudio de esta investigación, se recomienda divulgar estos resultados para que estén disponibles durante el proceso de sustentación de investigaciones a fines.
2. Evaluar la dosis adecuada del β -caroteno y Vitamina A para obtener un efecto antiparasitario eficaz.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

Agudelo, S., y Robledo, S. (2000). Respuesta Inmune en infecciones humanas por *Leishmania spp.* **Rev. IATREIA**, 13(3):167-173.

Allende, L. (1997). *Efectos del retinol (vitamina A) en la activación de linfocitos T humanos y sus implicaciones terapéuticas.* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.

Alvarado, J.A, González, M.A, Sardi, J.R. (1985). Leishmaniasis Tegumentaria Americana en el servicio de dermatología del hospital Universitario de Caracas. **Rev. Dermatología Venezolana.**

Arenas, M.C. (2010). Biología celular e histología médica: Tejido Epitelial. *Manual de prácticas, Departamento de Biología Celular y Tisular facultad de medicina, universidad nacional autónoma de México.* Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx>.

Balkwill, F, y Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*; 357(9255):539-45. **Rev ISSUE**, Doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0.

Bari, A. (2006). Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. **Rev. Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, 16(1): 24–27.

Begoña, O.A, Granado, F.L, y Blanco, N.I. (2001). *Carotenoides y Salud Humana.* Madrid, España: Edita Fundación Española de la Nutrición (FEN).

Biswas R, Goutam C, Kheya M , Debojyoti B , Sabyasachi M, y Tanmoy B. (2018). Retinol Levels in Serum and Chronic Skin Lesions of Atopic Dermatitis. **Rev. India J Dermatol**; 63 (3): 251–254.

Botero, D, y Restrepo, M. (2005). *Parasitosis Humanas*. Medellín, Colombia: Editorial Rojo, Corporación para investigaciones biológicas. 4ta Edición.

Botet, J, y Portús, M. (1993). La leishmaniasis en la España peninsular. Revisión histórica bibliográfica (1912-1985). **Rev San Hig**; 67(4):255-66.

Briviba, K, Schnäbele, K , Schwertle, E , Blockhaus, M , y Rechkemmer, G. (2001). Beta-carotene inhibits the growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. **Rev. Biol Chem**, 382 (12): 1663-8.

Bruna, L.M, Gardel, V.J, Rodrigues, F, y Freire, F. (2014). Dual Immune Modulatory Effect of Vitamin A in Human Visceral Leishmaniasis. **PlosOne**, 9(9):e107564. Doi:10.1371/journal.pone.0107564

Campione, E, Gaziano, R, Marino, D, y Orlandi, A. (2016). Fungistatic activity of all-trans retinoic acid against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. **Rev. Drug Design, Development and Therapy**, 10,1551- 1555.

Carlson, J.A; y Chen, K.R. (2006). Cutaneous vasculitis update: small vessel neutrophilic vasculitis syndromes. **Rev. Am J Dermatopath**, 28(6):486-506.

Carranco, J.M, Calvo, C.M, y Pérez, G.F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante. **Rev. Archivos Latinoamericanos De Nutrición**, 61(3)233-241.

Carrión, H.J, (2007). *Establecimiento de un modelo experimental para el estudio de la leishmaniosis. Estrategias de inmunización con lashistonas de Leishmania frente*

a la leishmaniosis cutánea y visceral. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España.

Chew, B.P, (1993). Role of Carotenoids in the Immune Response. **Rev. J Dairy Sci** 76(9):2804-281.

Convit, J , Ulrich, M, Castellanos, P.L, Castés, M, Pinardi, M, De Lima, H, Zerpa, O, Hernández, N, y Herz, A. (1996). Desarrollo de inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea americana en el Instituto de Biomedicina. **Rev.Gac Méd Caracas**, 104(3):232-246.

Cortés, L. (2011). *Seguimiento de la respuesta inmune generada tras la administración de varias proteínas de Leishmania infantum en ratones BALB/c. Análisis de la diversidad generada en el repertorio CDR3 y su relación con la inmunización y el desarrollo de la patología inducida por Leishmania.* (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, España.

Cui, B, Su, L, Qibo, W, y Xiaojun, L. (2012). Effect of β -Carotene on Immunity Function and Tumour Growth in Hepatocellular Carcinoma Rats. **Molecules**, Doi: 10.3390/molecules17078595.

Crowe, D.L, y Chandraratna, R.A. (2004). Research article: A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR- α is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator activated receptor ligands. **Rev. Breast Cancer Research**, 6(5):R546-55.

Domingo, G.A. (2004). *Leishmaniasis Cutánea: Estudio en el Área Sanitaria de Toledo.* (Tesis Doctoral).Universidad Complutense De Madrid, España.

Farmer, E.R, y Hood, A.F. (2000). *Pathology of the Skin*. United States: Editorial: McGraw-Hill Professional. 2th edition.

Fernández, J, y Armario, J. (2003). Retinoides en dermatología. **Rev. Med Cutan Iber Lat Am**, 31(5):271-294.

Fernández, O.M, y González, P.M. (2007). *Actualización en el Tratamiento global del acné vulgar*. (Tesis para Maestría) Universidad Autónoma de Barcelona, España.

García, D. (2004). *Leishmaniasis cutánea: Estudio en el área sanitaria de Toledo* (Tesis Doctoral).Universidad Complutense de Madrid, España.

Ham, A.W, y Cormack, D.H. (1983). *Tratado de Histología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Interamericana.

Harrison. R., Wintrobe M.M. (1973). *Leishmaniasis en: Medicina Interna*. Ciudad de México, México Editorial: McGraw-Hill Inc.

Iglesias, M (2003). Las Células Dendríticas y su Papel de Centinelas del Sistema Inmune. **Rev. Reumatología**, 19(4):168-169.

Hurtado, J. (2010). *Metodología de la Investigación Holística Guía para la comprensión holística de la ciencia*. Bogotá, Colombia: Ediciones Quirón.

López, M.T, Sánchez, S.P, Lahuerta, A.A, López, R, Oncins, T.R, y Griabal, G.M. (2011). Leishmaniasis, una enfermedad emergente en España: Presentación de 5 casos clínicos. **Rev. Med Cutan Iber Lat Am**, 39(1):13-18.

Magaña, G.M, y Magaña, L.M. (2011). *Dermatología*. México, D.F: Editorial Panamericana.

Marinkelle C. J., Rodríguez E. P. (1981). Progresos en Leishmaniasis. **Rev Trib. Med.** 1-6.

Martínez, S.B, Berzunza, C.M, y Becker, I. (2008). El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9. **Rev. Gac Méd Méx**, 144(2):99-104.

Montis, A. (1987). Retinoides. *Medicina Balear*. Mallorca, España: Edición Palma de Mallorca

Montserrat, C.M, Fortuño R.Y, y González, R.J. (2008). Diagnóstico de la necrosis cutánea. **Seminarios de la Fundación Española de Reumatología**. Doi: 10.1016/S1577-3566(08)74925-X

Navarrete, G.F. (2003). Histología de la piel. **Rev Fac Med UNAM**, 46(4).Ciudad de México- México.

Nesbitt, G, y Ackerman, L. (2001). *Dermatología Canina y Felina: diagnóstico y tratamiento*. Argentina: Editorial Intermédica.

Palella, S. y Martins, F. (2010). *Metodología de la investigación cuantitativa*. Venezuela: Editorial Fedeupel.

Reigada, C, Valera, E.A, Saye, M, Errasti, A.E, Avila, C.C, Miranda, M.R, yPereira C.A. (2017). Trypanocidal Effect of Isotretinoin through the Inhibition of Polyamine and Amino Acid Transporters in Trypanosoma cruzi. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11(3):1-19. Doi: 10.1371/journal.pntd.0005472.

Reviákina, V, y Panizo, M.M. (2001). Inmunopatogénesis de la candidosis sistémica e inmunomodulación. **Rev. Sociedad Venezolana de Microbiología**, 21(2):46-53.

Rodríguez, G. (2004). *Glosario Ilustrado De Dermatología y Dermatopatología*. Colombia: Editorial Unibiblos.

Saeb, L.M, Cortés, F.R, Vega, M.E, Hojyo, M.T, Guevara, M.E, y Domínguez, S.L. (1999). Principales fotodermatosis en Latinoamérica. **Rev Derm. Venez**, 37(1): 15-21.

Sánchez, L, Sáenz, E, Pancorbo, J, Zegarra, R, Garcés, N, y Regis, A. (2004). Leishmaniasis. **Rev. Dermatología Peruana**, 14 (2): 82–98.

Scorza, B.M, Carvalho, E.M, y Wilson, M.E. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International. Journal of molecular sciences**, 18(6): 1-26 Doi:10.3390/ijms18061296.

Soto, J, y Soto, P. (2006). Revisión De Tema: Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. **Rev. Biomédica**, 26(1):194-206.

Soria, X.G y Ribera, M, P. (2005). Revisión Biología de los receptores de los retinoides. **Rev. Servei de Dermatología**, 20(2):68-73.

Stevens, A, Lowe, J.B y Young, B. (2003). *Wheater Histopatología Básica*. España: Editorial S.A. ELSEVIER.

Tornero, M., (2004). *Retinoides como biomarcadores de contaminación en pequeños cetáceos* (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, España.

Torzecka, J.D, Dziankowska, B.B, Gerlicz, K.Z, y Wozniacka, A. (2016). The use of isotretinoin in low doses and unconventional treatment regimens in different types of

acne: a literature review. *Advances in Dermatology and Allergology*, 34(1):1-5. Doi: 10.5114/ada.2017.65614.

Ucci, M, Di Tomo, P, Tritschler, F, Vincenzo, G.P, Lanuti, P, Bolonia, G, DiSilvestre, S, Di Pietro, N, Pipino, C, Mandatori, D, Formoso, G, y Pandolfi, A. (2019). Research Article Anti-inflammatory Role of Carotenoids in Endothelial Cells Derived from Umbilical Cord of Women Affected by Gestational Diabetes Mellitus. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Doi: 10.1155/2019/8184656

Urbina, F. (2001). Queratosis artefacta. *Rev. Actas Dermo-sifiliográficas*, 92(3):88-91.

Vera, D, Vega, E, Quintanilla, M, y Arenas, R. (2006). Leishmaniasis. *Rev. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 4(4):252- 256.

Virga, V. (2003). Behavioral Dermatology. *Rev. Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 33 (2): 231-51, v-vi.

Weigel, R. X. Armijos, R. J. Racines, C. Zurita, R. Izurieta, E. Herrera y E. Hinojosa. (1994). La leishmaniasis cutánea en la región subtropical del Ecuador: percepciones, conocimientos y tratamientos populares. *Rev. Creencias sobre Leishmaniasis en el Ecuador*, 117(5).

Wojciech, P. (2015). *Histología texto y atlas correlación con biología molecular y celular*. Pensilvania: Editorial Wolters Kluwer.

Wolff, J, Weinberger, B, y Grubeck, B. (2012). The immunoregulatory effects of CMV-infection in human fibroblasts and the impact on cellular senescence. *Immunity and Ageing*, 29;9:1. Doi: 10.1186/1742-4933-9-1.

Young, B, y Heath, J.W. (2004). *Wheater's Histología funcional*. España: Editorial Harcourt.

Zuluaga M., Robledo S.M. (2004). Revisión de Tema Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis. **Rev. Biomédica**, 24:302-17.

www.bdigital.ula.ve