

Detección de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en el endotelio vascular de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada.

Ana Lugo-Yarbu¹, Manuel Valera¹, Maritza Alarcón¹, Elio Moreno¹,
Gloria Premoli-Percoco² y Cesare Colasante³

¹Investigaciones Parasitológicas "José Francisco Torrealba", Facultad de Ciencias

²Instituto de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología y ³laboratorio de Fisiología de la Conducta, Facultad de Medicina. Universidad de los Andes, Mérida. 5101. Venezuela.

Palabras clave: Leishmaniasis cutánea, amastigotos, microvasculatura dérmica, neutrófilos.

Resumen. En el presente estudio se analizaron las lesiones dérmicas de 8 pacientes con leishmaniasis cutánea (LC), procedentes de caseríos ubicados en las cercanías de las cuencas de los ríos Chama-Mocotíes del estado Mérida, Venezuela. Las lesiones de los pacientes fueron diagnosticadas de acuerdo al criterio clínico, parasitológico e inmunocitoquímico. Los parásitos de las lesiones cutáneas fueron identificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Histopatológicamente, las lesiones mostraron infiltrado inflamatorio de células mononucleares y polimorfonucleares. En la dermis se observaron reacciones granulomatosas y amastigotos. Los cortes histológicos de una de las lesiones del paciente N° 5 mostraron vasos sanguíneos morfológicamente afectados con antígeno de *Leishmania* en la superficie endotelial, vasos dilatados con parásitos en su luz y células mononucleares. El frotis de la misma lesión cutánea mostró amastigotos en el citoplasma de neutrófilos. Las reacciones de inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoperoxidasa indirecta (PAP) realizadas sobre estas lesiones, revelaron amastigotos y material antigénico adsorbido sobre las paredes de los vasos sanguíneos, así como amastigotos libres en la luz de los vasos sanguíneos dérmicos. Basados en estos resultados, se concluye que en la piel de algunas lesiones cutáneas, es posible reconocer la presencia de los parásitos tanto intracelulares como extracelulares, en estrecho contacto con los vasos sanguíneos dérmicos y libres en la luz capilar, lo que favorecería el desplazamiento del pará-

sito por vía sanguínea. Este proceso determinaría la posibilidad de producir infecciones secundarias y la propagación de la infección en las áreas endémicas de leishmaniasis, donde el parásito circula entre los reservorios domésticos y silvestres, los insectos vectores y el hombre que viven en esas áreas.

Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in vascular endothelium lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis

Invest Clín 2003; 44(1): 61-76

Key words: Cutaneous leishmaniasis, amastigotes, dermal microvessels, neutrophils.

Abstract. In the present study, we examined the cutaneous lesions of 8 patients with cutaneous leishmaniasis, from regions situated near the rivers Chama-Mocoties, in Merida state, Venezuela. The lesions of the patients were diagnosed on the basis of clinical, parasitological and immunological examinations. The Polymerase Chain Reaction (PCR) assay showed infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in cutaneous lesions samples. Histopathology of skin biopsy specimens showed inflammatory infiltrates of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. Granulomatous reactions and amastigotes were observed in the dermis. The histological sections of the cutaneous lesions in one patient (Nº 5), showed alterations in the integrity of dermal blood vessels, leishmanial antigens on the superficial endothelium and free parasites in the capillary lumen and inside mononuclear cells. The *Leishmania* amastigotes also were detected in the cytoplasm of neutrophils in Giemsa-stained imprints. The skin biopsies examined using immunofluorescence (IFI) and immunoperoxidase assay (PAP), showed amastigotes and antigenic material adsorbed on the vicinity of the walls of dermal microvessels. Based on these results, we concluded that in the cutaneous lesions it is possible to show the presence of intra and extracellular parasites, attached to wall of the dermal blood vessels and free, in the capillary lumen. The circulating parasites in peripheral blood may allow the possibility of developing secondary infections as well as the propagation of the infection in endemic areas of leishmaniasis, where the parasite circulates between domestic and wild reservoirs, vector insects and humans living in those areas.

Recibido: 05-11-2001. Aceptado: 14-10-2002.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad endémica tanto en el viejo como en el nuevo mundo, donde alrededor de 350 millones

de personas están expuestas al riesgo de contraer la infección y más de 12 millones de estas personas están infectadas. La incidencia es de aproximadamente 400.000 nuevos pacientes por año, constituyendo un

problema de salud pública en algunas regiones de América, Asia, África y Europa (1-3). Es una infección causada por alrededor de 13 especies y subespecies de parásitos pertenecientes al género *Leishmania* y transmitidos a través de la picadura de insectos hematófagos pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (4). Venezuela, al igual que la mayoría de los países neotropicales, es un área altamente endémica para la leishmaniasis donde son afectados tanto los pobladores rurales como los periurbanos, presentándose también situaciones endémicas, así como pacientes esporádicos en sitios suburbanos cercanos a áreas de vegetación (5-8).

En esas poblaciones, el curso de la infección en humanos y animales puede verse afectada por la respuesta inmune del hospedador, por la virulencia de las especies de *Leishmania* o por ambos factores, los cuales son capaces de producir un amplio espectro de la enfermedad que abarca desde la infección cutánea, la forma desfigurante de la mucosa oronasal hasta la forma letal de la leishmaniasis visceral (9, 10). El proceso inicial de la leishmaniasis cutánea se manifiesta por un foco de proliferación de macrófagos en la dermis, los cuales pueden producir metástasis por desplazamiento del parásito por vía sanguínea o linfática, pudiendo provocar focos secundarios patentes en la piel, mucosas o vísceras (11, 12). Otros autores han demostrado la dispersión de *L. braziliensis* desde el sitio de inoculación a los ganglios linfáticos (13), además de metástasis tardías en diferentes zonas de la piel, acompañadas de la invasión al hígado y al bazo en animales experimentales (14, 15). También se ha demostrado hipertrofia de las células endoteliales y vasculitis en los pacientes con Leishmaniasis cutánea (LC), así como la detección de los parásitos en los leucocitos polimorfonucleares de la sangre periférica (11, 16, 17). El presente trabajo describe los hallazgos histopatológicos en las lesiones dérmicas en ocho pacien-

tes con leishmaniasis cutánea y muestra la presencia de amastigotos extracelulares dispersos en la luz de los capilares sanguíneos dérmicos de la lesión cutánea de uno de los 8 pacientes examinados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes con Leishmaniasis cutánea

Un grupo de ocho pacientes provenientes de caseríos situados en la confluencia de los ríos Chama y Mocotíes, zona ubicada entre 71°54' de Latitud Oeste y 08°54' de Latitud Norte ocupada por los Municipios Autónomos Tovar, Pinto Salinas y Sucre del Estado Mérida, en Venezuela, fueron atendidos en el Servicio de Dermatología Sanitaria de Tovar (Fig. 1). Todos los pacientes fueron examinados y el estudio clínico registró la información relacionada con la residencia, ocupación y edad de los pacientes, así como

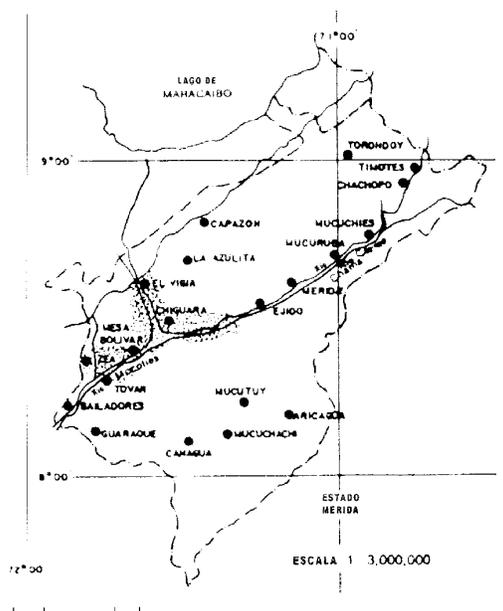


Fig. 1. Mapa geográfico que muestra el sector de las cuencas de los ríos Chama y Mocotíes con las localidades de procedencia de los ocho pacientes con leishmaniasis cutánea investigados (área punteada) en el estado Mérida, Venezuela.

la localización, el número y tiempo de evolución de las lesiones cutáneas. El test intradérmico de Montenegro (IDRM) fue aplicado a cada uno de los pacientes, inyectando intradérmicamente sobre la cara interna del antebrazo derecho una dosis de 0,1 mL de antígeno de *Leishmania sp.* El diámetro de la induración fue medido 48 horas después de aplicada la inyección y considerada positiva cuando fuera mayor de 5 mm de diámetro.

Exámenes microscópicos en los frotis de las lesiones cutáneas

Pequeños fragmentos del tejido cutáneo fueron separados del borde de las lesiones y frotados suavemente sobre láminas portaobjetos. Después de secado el material a temperatura ambiente, las preparaciones se fijaron con metanol durante 15 min y se colorearon con Giemsa al 20% en tampón Sörensen durante 45 min y luego examinados bajo el microscopio en las magnificaciones de 400x, 1000x y 2000x.

Estudio histopatológico de las lesiones cutáneas

Parte del material biopsiado fue cortado en pequeñas porciones y fijadas con formalina neutra al 10% durante 2 h. Después de la deshidratación en diferentes concentraciones de alcohol, las muestras fueron procesadas para la inclusión en Paraplast. Las secciones de 7 μ m cortadas en un microtomo (American Optical) fueron desparafinadas, hidratadas y coloreadas con Hematoxilina y Eosina (HE).

Aislamiento de los parásitos de las lesiones cutáneas

Pequeñas muestras de las lesiones cutáneas fueron separadas y transferidas a tubos de ensayo que contenían medio de cultivo NNN e incubados a 25°C. A partir de los 7 días los cultivos fueron revisados para la detección de las formas promastigotas del pa-

rásito. Otras muestras de las lesiones cutáneas fueron maceradas en PBS a pH 7,2, y un volumen de 0,2 mL del homogeneizado fue inyectado intradermalmente en la región dorsal tarsal de hamsteres machos (*Mesocricetus auratus*). Los tarsos de los animales infectados fueron revisados periódicamente para verificar el desarrollo de los nódulos cutáneos. Al cabo de tres meses estos animales fueron sacrificados por sobreenestesia con cloroformo y los fragmentos de las lesiones podales, del hígado y bazo fueron pasados a tubos con el medio de cultivo NNN para reconocer el desarrollado de los parásitos de *Leishmania* contenidos en estos tejidos.

Extracción y procesamiento de las muestras de sangre

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de los pacientes por venipuntura y centrifugadas a 12000 g durante 20 min para la separación del suero, 150 μ L de cada una de las muestras de suero fue agregado a 50 μ L de una suspensión de Chellex-100-iron (Bio-Rad Laboratories Hercules) al 20% y 1 μ L de proteinasa K (20 mg/mL), incubadas 1 h a 65°C y calentadas en baño de María por 10 min. La resina fue precipitada por centrifugación durante 1 min y porciones de 25 μ L del sobrenadante fueron separadas y utilizadas en cada ensayo de PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los oligonucleótidos F1 (5-GTCGGAGCAGGGACAGC-3') y F2 (5-CATCTGGAACCTCTCCC-3') fueron derivados de *L. braziliensis*. La mezcla de reacción consistió de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, Triton X-100 al 1%, 0,2 mM de cada NTPs, 1 μ M de cada iniciador y una unidad de Taq-polymerasa (Promega Corporation, Madison, Wis). La amplificación del DNA fue realizada en un termociclador (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.), con el siguiente perfil de tem-

peratura: 1er ciclo, 5 min a 94°C; 2do ciclo 10 veces (1 min a 60°C, 1 min a 72°C y 1 min a 94°C) y el 3er ciclo repetido 25 veces (1 min a 60°C, 1 min a 72°C, 1 min a 93°C). El cuarto ciclo consistió de 1 min a 60°C y 5 min a 72°C.

La electroforesis fue realizada colocando 10 µL de cada muestra producto de la PCR en geles de agarosa al 3%. Las bandas de DNA amplificadas fueron transferidas a filtros de nylon e hibridizadas con digoxigenina. El amplificado único de 126 pares de bases (pb) específico para *Leishmania (Viannia) braziliensis* fue visualizado con Bromuro de Etidio. El ensayo de la PCR fue controlado con un marcador de peso molecular pGEM (Promega), controles positivos representados por muestra de sangre de pacientes infectados con *L. braziliensis* y controles negativos formado por los componentes de la mezcla de la reacción libre de DNA. La prueba de hibridación fue detectada por quimioluminiscencia con un Lumi-pHos 530 (Boehringer Mannheim). El tiempo de exposición se mantuvo en un rango de 5 a 20 min. Todas las reacciones presentadas en este estudio fueron realizadas simultáneamente con cada muestra de sangre de los pacientes y con el mismo stock de reactivos, el mismo equipo y muestras controles.

Estudio serológico

La sangre de los pacientes fue colectada por venipuntura y mantenida a temperatura ambiente hasta la completa separación del suero sanguíneo. Las concentraciones de anticuerpo anti-*Leishmania* fueron determinados en el suero sanguíneo de los pacientes mediante la reacción de inmunofluorescencia indirecta (IFI), usando como antígeno promastigotos de *L. braziliensis* (M/HOM/Ve/93/MAMU-93) colocados sobre láminas portaobjeto y el anti-suero anti-humano IgG-FITC (Sigma, St. Louis) (18). El ensayo inmunoenzimático (ELISA) fue realizado siguiendo las instrucciones de

los reactivos comerciales (Sigma, St Louis). Cada paciente fue considerado positivo cuando las dos reacciones serológicas resultaron positivas.

Estudio inmunohistoquímico

Los cortes histológicos de 7 µm de las lesiones cutáneas de los pacientes fueron desparafinados, hidratados y procesados por la reacción de IFI. Los cortes fueron cubiertos con una solución de suero normal de cabra (SNC) al 30% en PBS a pH 7,2 y Tritón 0,1% (solución 1) durante 30 minutos. Luego fueron incubados con el antisuero de ratón anti-*T. cruzi* diluido 1:500 en la solución 1 durante 45 minutos en una cámara húmeda y a temperatura ambiente. Las preparaciones se incubaron con el antisuero anti-ratón IgG conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) diluido 1:500 durante 1 hora. Al cabo de este tiempo se lavaron 3 veces con PBS a pH 7,2, durante 5 min cada vez y se cubrieron con glicerina tamponada (9:1) y laminilla cubreobjeto para la observación de parásitos y antígeno fluorescente de *T. cruzi*.

La inmunotinción por PAP consistió en la incubación de los cortes de las lesiones cutáneas, con H₂O₂ al 3% en metanol por 30 min. Las preparaciones lavadas con PBS a pH 7,2 durante 5 min, fueron incubadas sucesivamente con SNC diluido 1:30 en la solución 1 por 30 min, antisuero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:30 en la solución 1 por 1 hora, lavadas 3 veces con PBS a pH 7,2, e incubadas con el antisuero de ratón IgG-Peroxidasa 1:500 (Sigma St. Louis) por 45 min. La reacción fue revelada con 3,3 Tetracloruro de Diaminobencidina y contracolorada con Hematoxilina de Mayer, hidratadas con alcohol isopropílico, xilol y cubiertas con Bálsamo de Canadá y laminilla cubreobjeto para la identificación de antígeno de *T. cruzi* (19).

RESULTADOS

Como se muestra en la Tabla I el grupo de pacientes estuvo conformado por 3 (37,5%) mujeres y 5 (62,5%) hombres con edades comprendidas entre 10 y 33 años. Estos casos presentaron de 1 a 3 lesiones cutáneas activas localizadas en la cara, brazos, tórax y piernas con 30 a 90 días de evolución, algunos pacientes mostraron lesiones ulceradas (Fig. 2). Los pacientes desarrollaron una IDR de Montenegro promedio

de 14x18 mm a 25x27 mm de diámetro. Los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* variaron entre 1:512 y 1:2048 y 1:800 y 1:4000 con las reacciones IFI y ELISA respectivamente. Los resultados de la PCR confirmaron la infección con *L. (Viannia) braziliensis* en todos los pacientes, con una banda única de amplificación de 126 pares de bases (pb), en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. En la Fig. 3 se observan los canales 2 y 3 correspondientes a los controles positivos formado por las

TABLA I
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LOS PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA

Caso N°	Edad (Años)	Sexo (M-F)	N° de lesiones	Ubicación de las lesiones	IDRM (mm)	Anticuerpos séricos IFI	ELISA	Inmuno Histoquímica IFI/PAP	PCR (Sangre)
1	10	M	1	Cara	17x22	1:512	1:800	+/+	+
2	16	M	2	Brazo-Cara	14x18	1:1024	1:3200	++/+	+
3	18	F	2	Pierna	18x13	1:512	1:4000	++/+	+
4	21	F	1	Cara	25x27	1:1024	1:800	+/+	+
5	21	M	3	Brazo-Pierna	18x21	1:2048	1:4000	+++/>++	+
6	25	M	2	Pierna	16x20	1:1024	1:1600	+/>+	+
7	31	F	1	Brazo	19x17	1:512	1:800	+/>+	+
8	35	M	1	Torax	15x20	1:1024	1:1600	+/>+	+

M: Masculino; F: Femenino; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; ELISA: Ensayo inmunoenzimático; PAP: Peroxidasa-anti-peroxidasa; Reacción positiva (+, ++, +++); PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.



Fig. 2. Lesión ulcerada en el brazo izquierdo de uno de los casos con leishmaniasis cutánea.

muestras de sangre de pacientes infectados con *L. braziliensis* y en los canales 1 y 13 los controles negativos desarrollados con la mezcla de reacción libre de DNA. Los canales 4 al 11 muestran la reacción positiva en las muestras de sangre de los 8 pacientes infectados con *L. (Viannia) braziliensis*. El canal 12 corresponde al pGEM-DNA usado como marcador de peso molecular.

La inyección intradérmica del homogeneizado de las lesiones cutáneas de cada paciente en los tarsos posteriores de los hamsters, produjo la formación de nódulos cutáneos con diámetro promedio de 10 mm, lo que demuestra la riqueza parasitaria del material inoculado así como la infectividad en el hígado y el bazo de estos animales.

Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

En los cortes histológicos de las lesiones cutáneas del paciente N° 5, fue frecuente la presencia de un intenso infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares dominantes en el área dérmica. Estas lesiones también mostraron la presencia de vasos sanguíneos dilatados con parásitos en su luz o en áreas de hemorragia en un tejido dérmico muy edematoso e inflamado cuya estructura normal está perdida (Figs. 4 a, b, c). Histológicamente todos los cortes de las lesiones cutáneas de los pacientes 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 que fueron coloreados con HE mostraron vasos sanguíneos de aspecto normal, escaso infiltrado celular y amastigotos dispersos en la región dérmica como se muestra en la lesión cutánea de uno de los pacientes estudiados (N° 8). En el resto de los pacientes la histopatología de las lesiones cutáneas fue similar a la observada en el paciente N° 8 (Figs. 4 d, e).

El ensayo inmunohistoquímico realizado sobre las secciones histológicas de la lesión cutánea del paciente N° 5 reveló una combinación de uno o más patrones antigénicos. La reacción de IFI mostró material

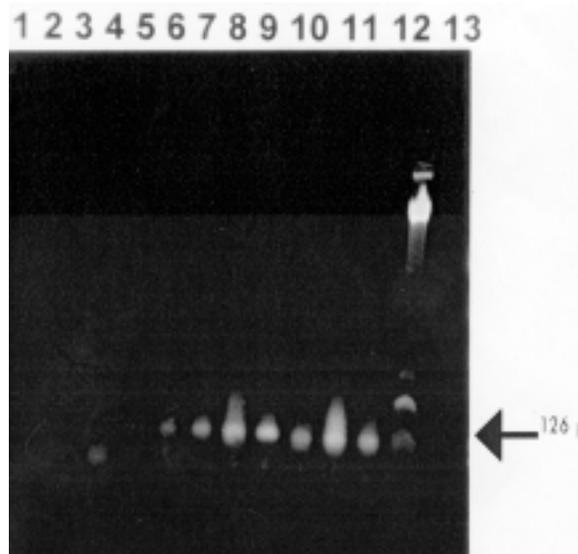


Fig. 3. Ensayo de PCR específico para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Las líneas 4 al 11 muestran señales positivas de amplificación por PCR banda única de 126 pb, desarrollada con las muestras de sangre de los 8 pacientes con leishmaniasis cutánea; 2 y 3 controles positivos; 1 y 13 controles negativos y la línea 12 muestra al pGEM-DNA usado como marcador de peso molecular.

antigénico sobre la superficie endotelial vascular y libres en la luz de los microcapilares dérmicos (Figs. 5 a, b, c). Con la reacción PAP el antígeno de *L. (Viannia) braziliensis* fue detectado en la superficie de las células endoteliales. Los frotis de la lesión cutánea del paciente No. 5 coloreados con Giemsa, mostraron abundantes amastigotos, plasmocitos y amastigotos en el citoplasma de los neutrófilos (Figs. 6 a, b).

DISCUSIÓN

Las diversas especies de *Leishmania* responsables de la enfermedad producen en los tejidos afectados severas reacciones celulares, las cuales se relacionan con una serie de eventos inmunológicos responsables de los diferentes aspectos clínicos observados en el hombre (20).

En el curso de la leishmaniasis tegumentaria americana sólo ocasionalmente pueden observarse *Leishmanias* intramonocíticas circulando en la sangre periférica (21), o dentro del citoplasma de eosinófilos y neutrófilos de lesiones cutáneas (22), mientras que en los pacientes con infecciones mucosas, esta condición intracelular del parásito usualmente no se observa asociada con la parasitemia de las células polimorfonucleares (11, 23, 24). Algunos investigadores consideran que esta asociación celular es observada en los frotis de sangre periférica de pacientes con leishmaniasis que se encuentran en condiciones clínicas muy particulares, lo que probablemente sea un factor indicativo de una alta densidad parasitaria en los pacientes con leishmaniasis visceral asociados al estado de inmunocomprometidos (25, 26). Estas aseveraciones han sido demostradas por el xenodiagnóstico aplicado a los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (27, 28), aun cuando el diagnóstico de la LC usualmente se basa en la identificación de los parásitos intracelulares en las muestras de lesiones cutáneas bien sea en cortes teñidos, en muestras de lesiones cultivadas, con el uso de anticuerpo monoclonal o por la prueba de PCR (29, 30). La observación intraleucocitaria de los amastigotos también confirma la infección por las diferentes especies de *Leishmania* (31). Robledo y col. (32), proponen que los anticuerpos específicos contribuyen con la persistencia de parásitos vivos en los monocitos de la sangre periférica, lo que sugiere que los amastigotos en los fagocitos mononucleares, contribuyen con la sobrevivencia de los parásitos. En tal sentido, pudiera asumirse que leishmanias viables en el torrente sanguíneo pueden ser transmitidas en áreas poblacionales donde el parásito circula entre los flebotominos transmisores, animales reservorios y el hombre que se encuentran en

las áreas endémicas andinas (33-35). Al contrario de lo que ocurre en algunas lesiones cutáneas infectadas con *L. braziliensis*, donde los parásitos son generalmente escasos y difíciles de detectar. En este estudio las preparaciones microscópicas de las lesiones cutáneas de los ocho pacientes examinados, mostraron abundantes amastigotos intradérmicos junto a una intensa reacción celular con alteración tisular, plasmocitos y amastigotos infectando neutrófilos. Estas observaciones indican el papel fagocítico de estas células contra el parásito. En este trabajo se observaron los parásitos tanto intracelulares en fagocitos polimorfonucleares, como extracelulares dispuestos en la luz de los vasos sanguíneos dilatados en un tejido dérmico muy edematoso e inflamado, como lo revelaron los cortes histológicos de fragmentos de una lesión del paciente N° 5 y coloreadas con HE. No se ha encontrado ninguna referencia que mencione este hecho. Este hallazgo pudiera estar relacionado con la diseminación hematogena de los parásitos, desde la lesión primaria o desde el sitio de inoculación de los promastigotos por la picadura de los flebotominos a la célula hospedadora, alcanzando de esta manera las cavidades y la posterior invasión de los órganos más profundos del cuerpo.

Numerosos esfuerzos han sido orientados a fin de conocer el proceso de dispersión de los parásitos de *Leishmania sp* o de sus productos antigénicos a otros tejidos, tales como el hepático y esplénico del hospedador vertebrado (23, 16, 11, 24, 36). En este estudio, los pacientes examinados corresponden a pacientes no inmunocomprometidos, en cuyas lesiones cutáneas fue detectada una alta densidad parasitaria, intenso infiltrado linfomonohistiocitario y destrucción dérmica, debida posiblemente a la presencia de inmunoglobulinas en los plasmocitos y a la acumulación de complejos inmunes (1). Por otro lado, en los cortes de la lesión del

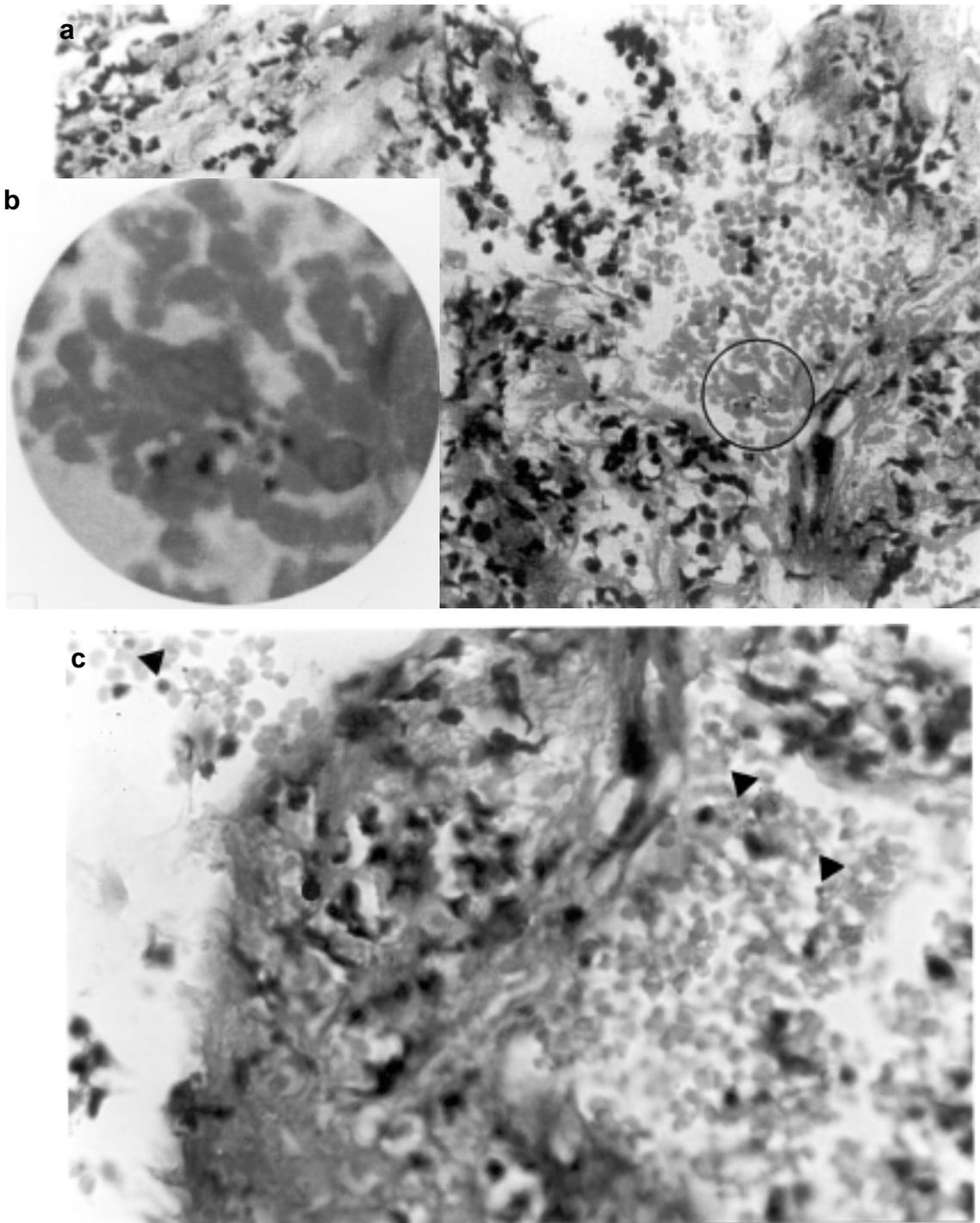


Fig. 4. Sección histológica de una lesión cutánea del paciente N° 5. a) células inflamatorias, tejido dérmico disgregado y amastigotos en un vaso sanguíneo dilatado (O) (Aumento 250X); b) ampliación de la Figura 4a, que muestra amastigotos entre un grupo de eritrocitos (O). c) tejido dérmico edematoso e inflamado y vasos sanguíneos dilatados con parásitos en su luz (▼) (Aumento 1000X).

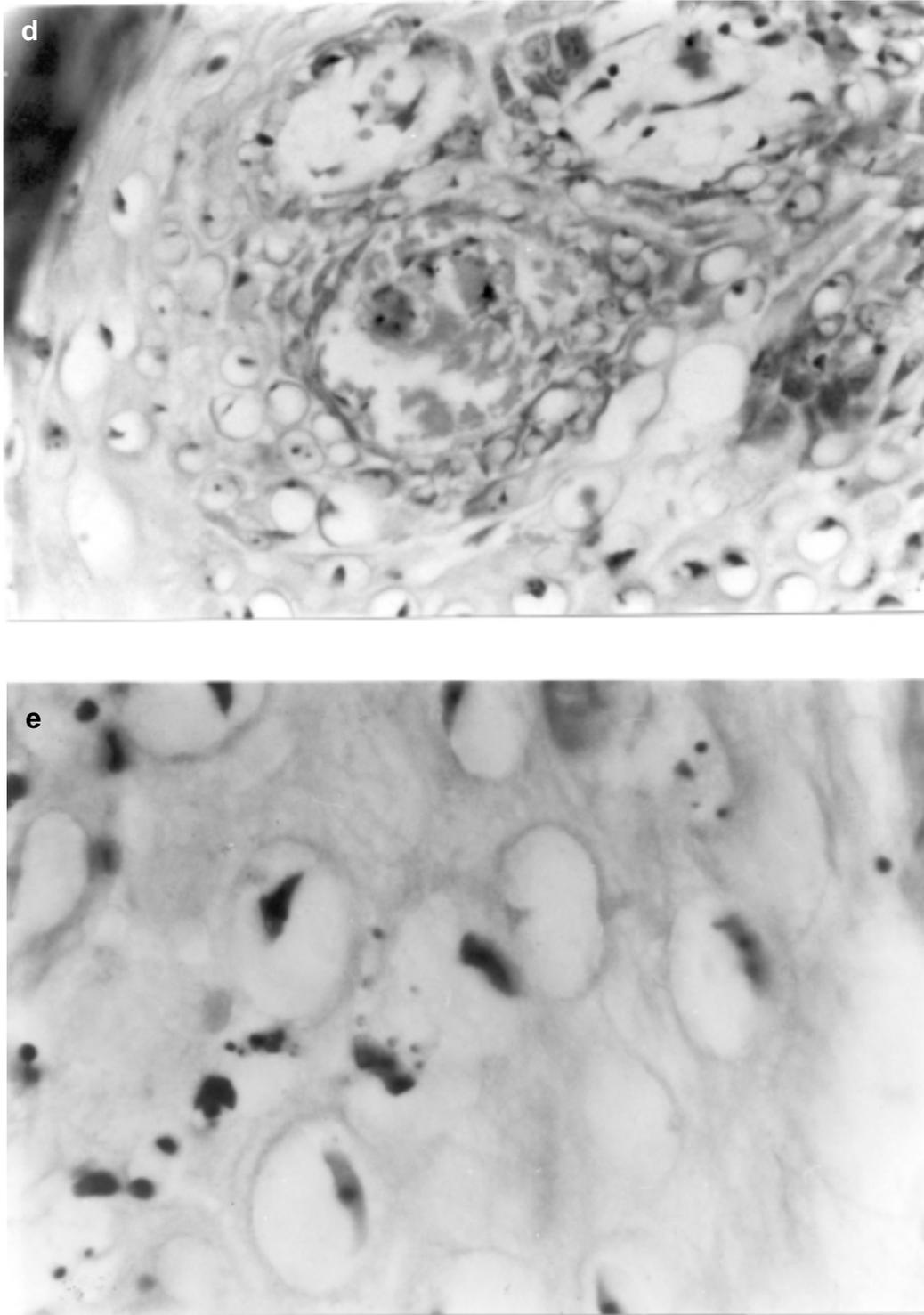


Fig. 4. Sección histológica de una lesión cutánea del paciente N° 5. **d** y **e**) cortes histológicos de una lesión cutánea del paciente N° 8 que muestran vasos sanguíneos dérmicos de aspecto normal, escasas células inflamatorias y amastigotos en la región dérmica (Tinción: Hematoxilina y Eosina). (Aumento1000X).

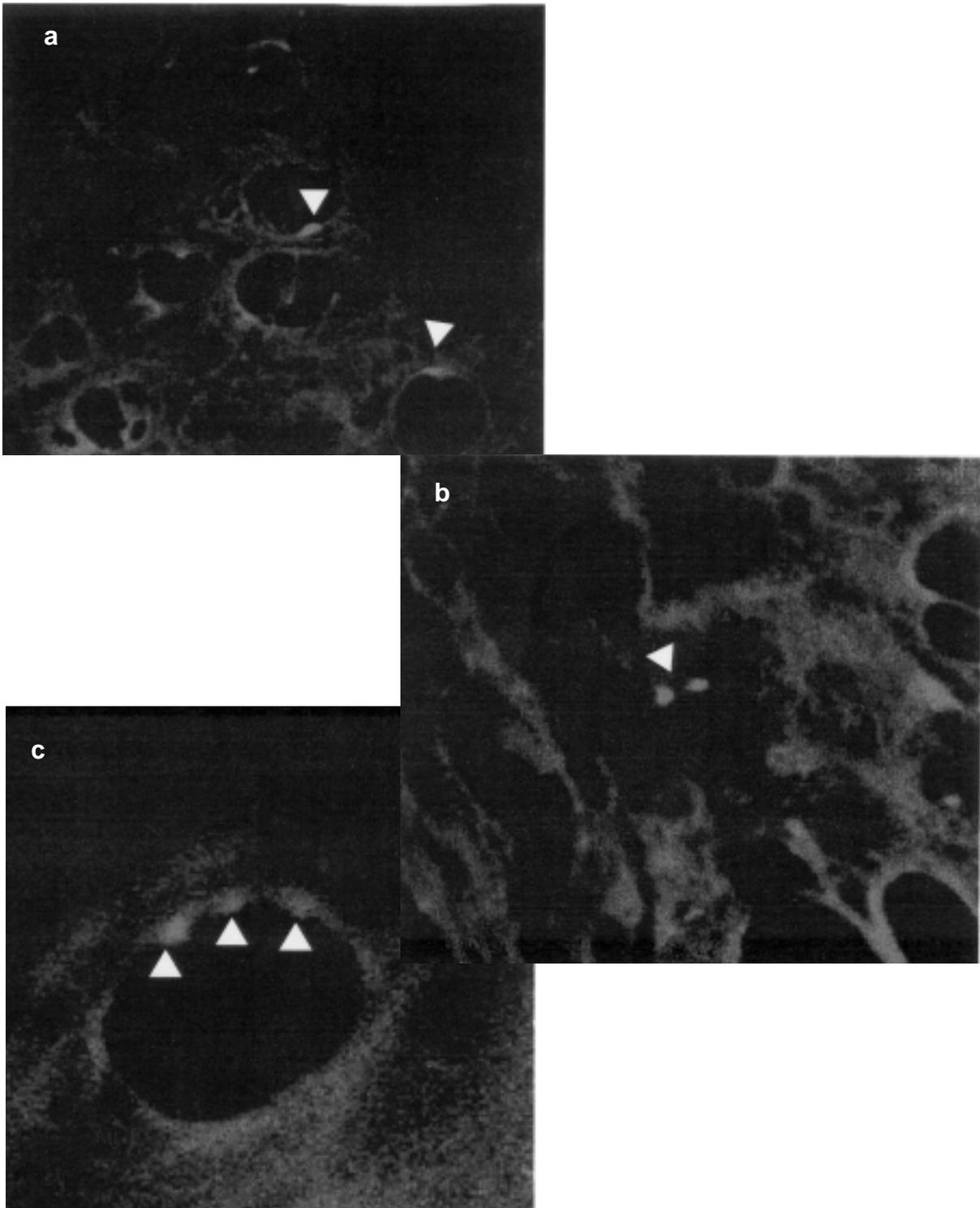


Fig. 5. Reacción de fluorescencia en un corte histológico de lesión cutánea del paciente N° 5. Se observa antígeno de *L. (Viannia) braziliensis* localizado: **a**) en la pared endotelial (▼); **b**) en la luz de un vaso sanguíneo dérmico (▼) y **c**) adherido al endotelio vascular dérmico (▲). (Aumento 1000X).

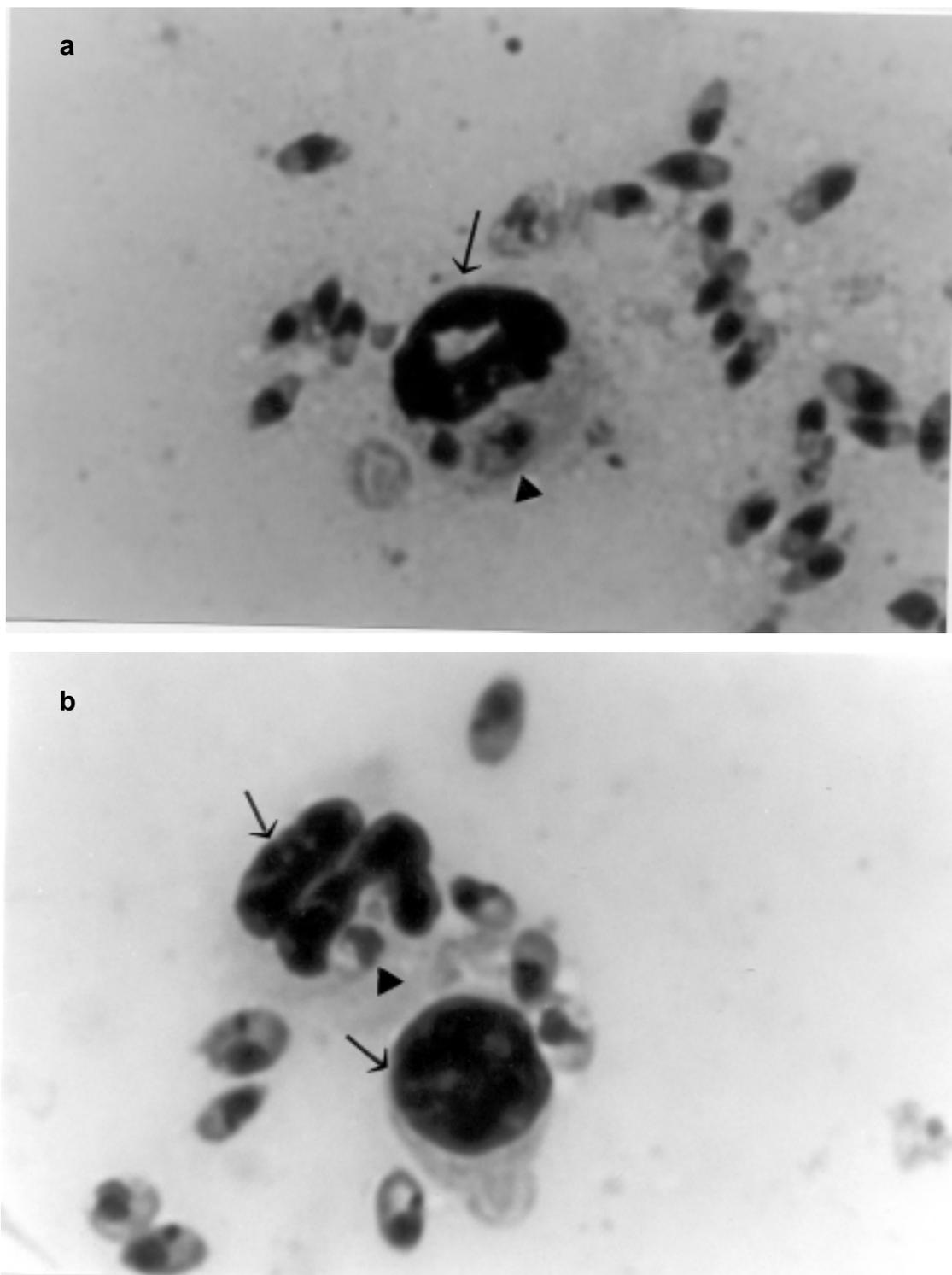


Fig. 6. Frotis de fragmento de una lesión cutánea del paciente N° 5 coloreado con Giemsa que muestra: **a)** Abundantes amastigotos y un neutrófilo (→) con un amastigoto en su citoplasma (▲) y **b)** plasmocito (→) y un neutrófilo (→) con un amastigoto en su citoplasma (▲). (Aumento 2000X).

paciente N° 5 la reacción de IFI y PAP revelaron, además, depósitos de antígeno de *Leishmania*, algunos asociados con las células endoteliales de los vasos sanguíneos dermales, lo que posiblemente corresponda al antígeno soluble de *Leishmania* según lo reportaron Ridley y Ridley (37). A diferencia de lo que ocurre en las lesiones de la mucosa nasal profunda en humanos con leishmaniasis mucocutánea, donde se observan amastigotos en el endotelio vascular proliferante junto al infiltrado perivascular celular, licuefacción del cartílago y vasculitis aguda con necrosis coagulativa de las paredes de los pequeños vasos sanguíneos (1). En la lesión cutánea del paciente N° 5, el material inmunofluorescente detectado en la superficie de los vasos sanguíneos dérmicos, pudiera ser interpretado como restos antigénicos digeridos por los macrófagos y adsorbidos sobre la superficie interna de la microvasculatura dérmica. Este material antigénico pudiera representar el exoantígeno citofílico, como fuera descrito por Farah y col. (38) en LC del viejo mundo y por Sells y Burton (39) en leishmaniasis experimental en ratas por la técnica de inmunoperoxidasa.

Generalmente se acepta que en humanos los parásitos de *Leishmania* crecen, se multiplican y pueden vivir a salvo dentro del macrófago hospedador y sólo pueden ser destruidos fuera de estas células (40, 41), a diferencia de lo que ocurre con los amastigotos de *Leishmania* que infectan a los lagartos, los cuales se multiplican primariamente en los trombocitos. Este hecho ha sido interpretado como un estado temprano en la adaptación de los parásitos al hospedador vertebrado, en el cual aparentemente se comportan como parásitos de las células en la sangre periférica, siendo este un paso evolutivo el cual precede a la adaptación viscerotrópica o dermatotrópica (42).

Recientemente, Domínguez y Toraño (43) señalaron la importancia de la relación que se establece entre los promastigotos de

Leishmania con las plaquetas y los eritrocitos, principalmente en la eliminación de los parásitos en los seres humanos resistentes a la infección y en otros vertebrados infectados con *Leishmania*. Otros investigadores han demostrado que estos parásitos pueden ser destruidos dentro de las células, lo cual indica el activo papel de las células hospedadoras contra el parásito. No está muy claro si la célula tiene éxito en matar al parásito o si en condiciones desconocidas, éste es capaz de matar a la célula, escapar de ella y quedar finalmente circulando extracelularmente (44, 45).

El conocimiento de las relaciones entre las leishmanias y las células de sus hospedadores, es de considerable importancia para conocer tanto el establecimiento de la infección como el destino del parásito (22). En este estudio los mecanismos de destrucción celular son desconocidos. La observación de los amastigotos libres dentro de los vasos sanguíneos dérmicos, pudiera ser interpretada como el resultado del ataque parasitario contra la célula hospedadora, por lo que la circulación sanguínea de los parásitos conducirían al establecimiento de nuevas lesiones cutáneas en otras regiones del cuerpo de los pacientes infectados. En este sentido, la presencia de parásitos en la circulación sanguínea y el infiltrado celular mononuclear alrededor y sobre las capas superficial y profunda de los vasos sanguíneos dérmicos, revelarían en cierta forma otra de las características diferenciales del subgénero *Leishmania* (46). También se ha argumentado que el estado de "especiación" del subgénero *Viannia*, le adjudicaría diferencias importantes en los patrones de evolución de la infección y en el desarrollo de los nódulos y úlceras cutáneas, hechos que pudieran quedar determinados por la virulencia y la capacidad de visceralización de los parásitos del subgénero *Leishmania* (47, 48). Otras investigaciones han relacionado la presencia de *L. (Viannia) braziliensis* en las lesiones cutáneas curadas y en la sangre

de pacientes que recibieron un prolongado tratamiento antimonial, con la participación de estos pacientes en el ciclo de transmisión de la enfermedad tanto en áreas endémicas como en las no endémicas (49).

AGRADECIMIENTOS

Al C.D.C.H.T. de la Universidad de los Andes por el soporte financiero Proyectos: C-1011-00-03-A, C-1012-00-03-B, C-1049-00-03-C y CONICIT G 97000820

REFERENCIAS

1. WHO. TDR News 1991; 36;1.
2. Ashford R, Desjuex P, De Raadt P. Estimation of population risk of infection and number of cases of leishmaniasis. Parasitol Today 1992; 83:104-105.
3. Grimaldi G, Tesh R. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 1993; 6:230-250.
4. Lainson R, Shaw J. The leishmaniasis. In Biology and Medicine Morphology Ultrastructure and life cycles. 1987; Vol I, Cap 2, pág. 121.
5. Valera M, Moreno E, Scorza JV. Cincuenta y seis casos de leishmaniasis tegumentaria en la cuenca de los ríos Chama-Mocoties (Estado Mérida, Venezuela). Bol Dir Malariol San Amb 1978; 28:238-247.
6. Scorza JV, Valera M, Moreno E, Jaimes R. Epidemiologic survey of cutaneous leishmaniasis: an experience in Merida, Venezuela. Bull Pan Am Health Organ 1983; 17:361-373.
7. Maingón R, Feliciangeli D, Guzman B, Rodríguez N, Convit J, Adamson R, Chance M, Petralanda I, Dopugherty M, Ward R. Cutaneous leishmaniasis in Tachira state, Venezuela. Ann Trop Med Parasit 1994; 88:29-36.
8. Lugo-Yarbuh A, Premoli-Percoco G, Moreno E. Detection of localized cutaneous leishmaniasis using conventional assay and Polymerase Chain Reaction: a report on three Venezuelan family groups. Bol Dir Malar San Amb 1999; 39: 20 – 26.
9. Morris L, Aebishcher T, Handman E, Kelso A. Resistance of BALB/c mice to *Leishmania major* infection is associated with decrease in the precursor frequency of antigen-specific CD4+ cells secreting interleukin-4. Int Immunol 1993; 5:761-767.
10. Tapia F, Cáceres-Dittmar G, Sanchez M, Fernandez A, Convit J. The cutaneous lesion in american leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. Biol Res 1993; 26: 239-247.
11. Martínez JE, Arias AL, Escobar MA, Saravia NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two case of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. Trans Roy Med Hyg 1992; 86:392-394.
12. Isaza DM, Restrepo M, Restrepo R, Cáceres-Dittmar D, Tapia FJ. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesion from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg 1996; 55:365-369.
13. Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. Parasitol Today 1985; 1:129-133.
14. Moreno E, Scorza JV. Comportamiento *in vivo* e *in vitro* de siete aislados de *Leishmania garnhami* del occidente de Venezuela. Bol Dir Malar San Amb 1981; 21:179-191.
15. Lugo-Yarbuh A, Añez N, Nieves E. Estudios comparativos sobre el curso de la infección por *Leishmania* sp. en varios modelos vertebrados. Parasitol al Día 1993; 17:3-4.
16. Cuba-Cuba CA, Llanos-Cuentas EA, Marsden PD. Failure to detect circulating *Leishmania* in mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80:346.
17. Gaafar A, El Kadaro AY, Theander TG, Permin H, Ismail A, Kharazmi A, El Hasaan AM. The pathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Sudan. Am J Trop Med Hyg 1995; 52:438-442.

18. **Luño-Yarbuh A, Añez N, Valera M, Moreno E.** Detección de títulos de anticuerpos, proteínas totales, albúmina y globulina en casos de leishmaniasis cutánea tratados con Glucantime. *Parasitol al Día* 1996; 20:20-26.
19. **Premoli-Perceco G, Luño-Yarbuh A, Guevara P, Gonzalez C.** *In situ* hybridization and immunoperoxidase for quick detection and identification of *Leishmania braziliensis* in tissue. *Parasitol al Día* 1996; 20:86-90.
20. **Melby PC.** Experimental leishmaniasis in humans. *Rev Infect Dis* 1991; 13:1009-1017.
21. **Silvera FT, Lainson R, Shaw JJ, Ishikama EA, Souza A, Adelson AA, RR.** Sobre a sensibilidade da cultura de leucocitos circulantes na deteco de *Leishmania* no sangue periferico de pacientes com leishmaniose tegumentar. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22:143-146.
22. **Bhutto A, Nonaka S, Gomez EA, Hashiguchi Y.** Estudios de microscopía electrónica de leishmaniasis cutánea en el Ecuador. Estudios sobre la leishmaniasis en el nuevo mundo con especial referencia al Ecuador. Serie de reportes de Investigación. 1992; 3:94-109.
23. **Bowdre JH, Campell JL, Walker DH, Tart DE.** American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leucocytes. *Am J Clin Pathol* 1981; 75:435-438.
24. **Nuwary-Salti N, Mu'atasseem D, Salman S, Izzedine N, Kibbi AG.** Chronic cutaneous leishmaniasis: *Leishmania* parasites in blood. *Int J Derm* 1992; 31: 562-564.
25. **Fillola G, Corberand JX, Laharraque PF, Levenes H, Massip P, Recco P.** Peripheral intramonocytic *Leishmania* in an AIDS patient. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3284-3285.
26. **López-Velez R, Laguna F, Alvar J, Pérez-Molina JA, Molina R, Martínez P, Villarrubia J.** Parasitic culture of buffy coat for diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:937-939.
27. **Laguna F, García-Samaniego J, Soriano V.** Leishmaniasis gastrointestinal en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev Clin Exp* 1994; 194:70-71.
28. **Medrano FJ, Jiménez-Mejias E, Calderon E, Regodan C, Leal M.** An easy and quick method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals. *AIDS* 1994; 7:1399.
29. **Anthony RL, Groggi M, Sacchi JB, Ballou RW.** Rapid detection of *Leishmania* amastigotes in fluid aspirates and biopsies of human tissues. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37:271-276.
30. **Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, Rakiff H, Bloom BR.** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2246-2252.
31. **Omar M, Almagro M, Navarro JM, Aliaga L.** Detección de *Leishmania* en sangre periférica. *Sangre (Bare)* 1994; 39:228-229.
32. **Robledo S, Wozencraft A, Valencia AZ, Saravia N.** Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility *in vitro* with clinical phenotype. *J Immunol* 1994; 1265-1276.
33. **Luño-Yarbuh A, Scorza JV.** Ensayos metodológicos para la investigación de reservorios de *Leishmania* spp en los andes venezolanos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1982; 77:367-384.
34. **Scorza JV, Rezzano S, Marquez JC.** *Didelphis marsupialis*, reservorio primario de *Leishmania* spp. en la ciudad de Trujillo, Venezuela. *Bol Dir Malar San Amb* 1986; 26:1-5.
35. **Passwell JH, Shor R, Smolen J, Jaffe CL.** Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *J Exp Path* 1994; 75:277-284.
36. **González C.** Demostración de la dispersión de *Leishmania* en el vertebrado con especial referencia al efecto de procesos inflamatorios. [Trabajo de Ascenso] Mérida: Universidad de los Andes. 1996.
37. **Ridley MJ, Ridley DS.** Monocyte recruitment antigen degradation and localization in cutaneous leishmaniasis. *Br J Exp Pathol* 1986; 67:209-218.

38. Farah FS, Samra SA, Nuwayri-Salti N. The role of the macrophages in cutaneous leishmaniasis. *Immunol* 1975; 29:755-764.
39. Sells PG, Burton M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:461-468.
40. Berman JD, Dywer DM, Wyler DJ. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro*. *Infect Immunol* 1979; 26:375-379.
41. Bretaña A, Avila JL, Lizardo G, Convit J, Rondon AJ. *Leishmania* species: comparative ultrastructure of experimental nodules and diffuse human cutaneous lesions in American leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1983; 55:377-385.
42. Telford Jr S. Evolutionary implications of *Leishmania* amastigotes in circulating blood cells of lizards. *Parasit* 1979; 79: 317-324.
43. Domínguez M, Toraño A. *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. *Parasit Immunol* 2001; 23:259-265.
44. Mael J, Buchmuller Y, Behin R. Studies on the mechanisms of macrophage activation. I. Destruction of intracellular *Leishmania enrietti* in macrophages activate by cocultivation with simulated lymphocytes. *J Exp Med* 1978; 148:393-407.
45. Buchmuller Y, Mael J. Studies on the mechanism of macrophage activation. III. Parasite destruction in macrophages activated by supernates from Concanavalin A stimulated lymphocytes. *J Exp Med* 1979; 150:359-370.
46. Schubach A, Marzochi MCM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira ALC, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Cointinho SG, Marzochi KBF. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patient: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:824-827.
47. Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura EL. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Biological behavior in golden hamsters of isolated from argentine patients. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:115-118.
48. Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology: New world. The leishmaniasis. Vol. 1. Chap. 7. London: Academic Press; 1978, p 291-363.
49. Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch M, Countinho SG. Cellular and humoral immune response of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:511-512.