

Efecto del tratamiento intralesional con clorhidrato de emetina sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* en hámsteres.

Dalmiro Cazorla¹, José Yépez¹, Néstor Añez³ y Auristela Sánchez de Mirt².

¹Unidad de Parasitología y Medicina Tropical y

²Unidad de Microscopía Electrónica, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro, Estado Falcón, Venezuela y

³ Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Correo electrónico: lutzomyia@hotmail.com

Palabras clave: Quimioterapia, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, hámster, microscopía electrónica.

Resumen. Se compara el efecto terapéutico del alcaloide clorhidrato de emetina administrado dentro de la lesión (IL) con el del tratamiento sistémico convencional con Glucantime[®] sobre lesiones de hámsteres machos, heterocigotos, experimentalmente infectados con 4×10^3 amastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Se demuestra que la aplicación de ambos agentes quimioterapéuticos reduce significativamente ($P < 0,01$) los tamaños promedio de las lesiones cuando se comparan con los animales control no tratados. Se halló que los resultados clínicos obtenidos con la aplicación del alcaloide, son similares a los observados con el Glucantime[®], ambos redujeron el tamaño de las lesiones leishmánicas ($P > 0,05$). Los efectos ultraestructurales en los parásitos leishmánicos expuestos a la acción quimioterapéutica de la emetina, se evidenciaron principalmente en el interior del citoplasma de los amastigotes, que se mostró intensamente vacuolizado, desordenado e indefinido; sin embargo, no fue posible relacionar directamente las observaciones ultraestructurales con los mecanismos de acción conocidos de la emetina. La presencia de parásitos viables fue demostrada en lesiones activas y/o cicatrices, en todos los hámsteres evaluados después de 75 a 230 días post-tratamiento, mediante los métodos de frotis directo, histopatología convencional, medios de cultivo (NNN) y la técnica de la inmunoperoxidasa; esta última tiene una sensibilidad del 100%. Estos

hallazgos sugieren que además de la medición del tamaño de las lesiones cutáneas, debe realizarse la búsqueda de parásitos leishmánicos remanentes como método válido para evaluar la eficacia de la quimioterapia en la LT experimental. La detección de amastigotes en lesiones curadas clínicamente, apoya la hipótesis de considerar al hombre como un posible reservorio intradomiciliar.

Effect of the intralesional treatment with emetine hydrochloride on *Leishmania (Viannia) braziliensis* in hamsters.

Invest Clín 2001; 42(1): 5-21

Key words: Chemotherapy, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, hamster, electron microscopy.

Abstract. The therapeutic effect of the emetine hydrochloride alkaloid administered intralesionally was compared with that of standard parenteral treatment with Glucantime® in outbred male hamsters experimentally infected with 4×10^3 amastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Both chemotherapeutic agents reduced significantly ($P < 0.01$) the average lesion sizes in experimental animals in comparison with those untreated. The alkaloid infiltration was found to be as effective as the antimonial injection for clinical resolution. The ultrastructural effects on the *Leishmania* parasites exposed to emetine were observed mainly in the inner cytoplasm, which appeared disorganized, pycnotic and with loss of morphological definition; however, any known emetine hydrochloride action mechanism factor could not be directly related with ultrastructure effects detected on leishmanial parasites. Smears, conventional histopathology, culture in NNN medium and indirect immunoperoxidase method showed viable amastigotes in nodules and/or scars of all the evaluated hamsters 75 to 230 days after the end of treatment. These findings suggest that measurement of the size of cutaneous leishmanial lesions does not appear to be a valid criterion for evaluating the efficiency of chemotherapy in experimental LT. Detection of leishmanial parasites in the lesion scars, supports the hypothesis that man could be considered as an intradomiciliar reservoir.

Recibido: 03-09-2000. Aceptado: 30-11-2000.

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis tegumentarias (LT) son entidades nosológicas prevalentes en prácticamente la to-

talidad de las entidades federales de Venezuela, donde se registra un promedio de 2.095 casos por año, siendo por lo tanto un problema de salud pública en el país (1, 2, 3). En

Venezuela la aparición de complicaciones mucosas, que incluyen perforación del *septum* nasal, desaparición del lóbulo nasal y deformación del labio superior, puede presentarse entre el 10 y 20% de los casos, especialmente en aquellas infecciones producidas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, donde puede ocurrir precozmente el ataque a la mucosa o después de 5 a 8 años de haberse curado la lesión cutánea, aunque también se registran casos hasta después de 30 años (4).

Los tratamientos inmunoterapéuticos e inmunoprolifáticos en uso, han demostrado limitada efectividad, y, hasta el presente, la quimioterapia es el medio más efectivo y práctico para la terapia contra las LT (5, 6). Sin embargo, no existe acuerdo general, ni criterio uniforme y definido para el tratamiento ideal de las LT. En Venezuela, la droga de elección ha sido el antimonio de N-metil glucamina (Glucantime[®]), administrado por vía intramuscular (IM) (1). Este antimonial pentavalente (Sb^v) puede producir efectos colaterales de consideración sobre el funcionalismo hepático, cardíaco, pancreático y renal (6, 7, 8), y a pesar de ello su uso es extensivo. Cuando se prescribe, debe tomarse en cuenta el alto costo de un tratamiento promedio con esta droga (1), su dificultad de aplicación durante largos periodos (6), y la posibilidad de que los pacientes desarrollen resistencia clínica hacia el Sb^v (9, 10). En los casos de resistencia se han administrado otros compuestos, que incluyen, entre otros, pentamidina

(11), anfotericina B (12), ketoconazol (13) y rifampicina (14); sin embargo estos tratamientos son poco efectivos, muy prolongados, relativamente costosos y a veces se requiere la hospitalización del individuo. Como alternativa terapéutica a los indicados arriba, recientemente en nuestro país se ha ensayado con éxito, la administración de fármacos intralesión (IL), especialmente Glucantime[®], lidocaina y la mezcla de ambos, con la subsecuente reducción en la administración de grandes cantidades de los antimoniales, y, por ende, de la toxicidad y los costos (15, 16).

La emetina es un alcaloide isoquinoleínico que se extrae de las raíces y rizomas de la ipecacuana (*Cephaelis ipecacuhna*), que se ha utilizado por décadas en el tratamiento de la disentería y abscesos hepáticos ocasionados por *Entamoeba histolytica* (17). De acuerdo a la literatura revisada, la emetina no se ha utilizado en el tratamiento clínico de las leishmaniasis del Neotrópico. Por contraste, este alcaloide, y su derivado sintético dehidroemetina, se han administrado con eficacia contra las LT humanas y de animales experimentales del Viejo Mundo, especialmente en países del Medio Oriente (18, 19, 20, 21). Hasta el presente se desconocen los cambios ultraestructurales ocasionados por la emetina en los parásitos leishmánicos.

A la luz de lo anteriormente expuesto, y en la búsqueda de nuevos y eficientes esquemas terapéuticos alternativos, en el presente trabajo

nos propusimos ensayar acciones quimioterapéuticas, por vía IL, del clorhidrato de emetina y comparar los resultados con los del tratamiento convencional por vía IM, del antimonial pentavalente Glucantime®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

L. (V.) braziliensis, cepa MHOM/VE/82/ZC, aislada de una paciente de 14 años de edad, procedente de Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela. La cepa ha sido mantenida mediante repiques sucesivos en hámsteres machos.

Animales e infecciones experimentales

Se utilizaron hámsteres machos heterocigotos de 2 a 3 meses de edad, con pesos comprendidos entre 100 y 120 g. Los animales fueron inoculados por vía subcutánea en la base de la cola con 0,1 mL de solución salina estéril al 0,85% que contenía 4×10^3 amastigotes, los cuales se obtuvieron de lesiones tarsales de hámsteres machos.

Fármacos

Antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®, Specia) manufacturado por Laboratorio Rhone Pulenc, y clorhidrato de emetina de Laboratorios Berens y Pulmbronk.

Protocolo para la aplicación de las drogas

En todas las experiencias, el inicio de los regímenes quimioterapéuticos se llevó a cabo entre 45 y

60 días después de la inoculación, cuando los hámsteres exhibieron lesiones leishmánicas con diámetros entre 6 y 8 mm. El grupo control (11 hámsteres que no recibieron tratamiento) recibió diariamente inyecciones intramusculares (IM) de solución salina al 0,85% durante 80 días; el grupo para el tratamiento convencional o sistémico (N = 13) fue tratado con Glucantime® más solución salina 0,85% (1:6 v/v), a dosis diaria IM de 80 mg/Kg durante 20 días por 4 ciclos, con 10 días de reposo entre ciclos. Finalmente, otro grupo de 17 hámsteres recibió 3 dosis IL de 1 mg/Kg de clorhidrato de emetina más solución salina 0,85% (1:20 v/v), con ciclos de tres semanas de reposo entre dosis durante 3 meses.

Evaluación de los tratamientos

Después de la primera infiltración de las drogas, la evaluación clínica de los tratamientos se realizó semanalmente, durante 24 semanas, mediante la medición de los diámetros de las lesiones dérmicas con un calibrador (Vernier) con precisión para 0,1 mm. En ensayos previos, se observó que la administración por vía IL del clorhidrato de emetina fue extremadamente irritante para los animales, aun a la dosis de 1 mg/Kg, debido a la hipertrofia del sitio de aplicación y su posterior ulceración, con formación de abscesos y/o escamocostras. Debido a esto, la evaluación clínica del tratamiento resultaba complicada, por lo que se decidió complementarla con una evaluación de tipo histo-

patológico, para determinar la abundancia parasitaria presente durante la infiltración del fármaco. Para ello, se sacrificaron, por sobreeanestesia con vapores de éter, dos hámsteres por cada grupo experimental (tratamiento con emetina y control), de los cuales se extrajo por disección un fragmento de lesión granulomatosa. Estos se fijaron en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina, para hacer cortes con microtomo, los cuales se colorearon con hematoxilina-eosina (H & E). La cantidad de parásitos (amastigotes) se estimó según el recuento de los mismos por campo de 400 X.

Setenta y cinco a 230 días después de concluidos los periodos experimentales de tratamiento con los fármacos, se seleccionaron al azar entre 1 y 4 hámsteres curados o no, por cada grupo de tratamiento, para evaluar la cura parasitológica mediante frotis directo, histopatología convencional, cultivo y el método de la inmunoperoxidasa. Se sembraron muestras de sangre periférica y biopsias de lesiones dérmicas, hígado y bazo en medio de cultivo de Novy, McNeal y Nicolle (NNN). Al mismo tiempo, se extrajeron muestras adicionales de biopsias, y se hicieron improntas que se fijaron con metanol y colorearon con Giemsa. Para la realización de las pruebas de histopatología convencional y la coloración por la inmunoperoxidasa, las muestras de tejidos se fijaron en formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron siguiendo el método de Giemsa-colofonio propuesto por Bray & Garhnam (22) y

la metodología descrita por Sells & Burton (23), respectivamente. Además, también se evaluó el efecto de los fármacos sobre la ultraestructura de los parásitos leishmánicos, tal como se describe abajo.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La toma de muestra de las lesiones granulomatosas se hizo de la misma forma que para el estudio histopatológico descrito arriba. Al igual que aquél, el estudio ultraestructural sólo se realizó con el grupo de hámsteres tratados con la emetina IL, y sus respectivos controles no tratados, debido a que el efecto del Glucantime[®] sobre la ultraestructura de *L. (V) braziliensis* ya fue reseñado en un trabajo previo (24). Una vez tomadas las biopsias, se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 mm³, se procesaron y evaluaron de acuerdo a procedimiento descrito en un artículo anterior (24).

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre las medias de los diámetros lesionales después de los diferentes tratamientos, se calculó mediante las pruebas de variancia no paramétrica de Kruskal-Wallis y de comparación múltiple de Student-Newman-Keusl.

RESULTADOS

Desarrollo de lesiones por *Leishmania (V) braziliensis* en hámsteres machos

Los hámsteres machos inoculados en la base de la cola con amasti-

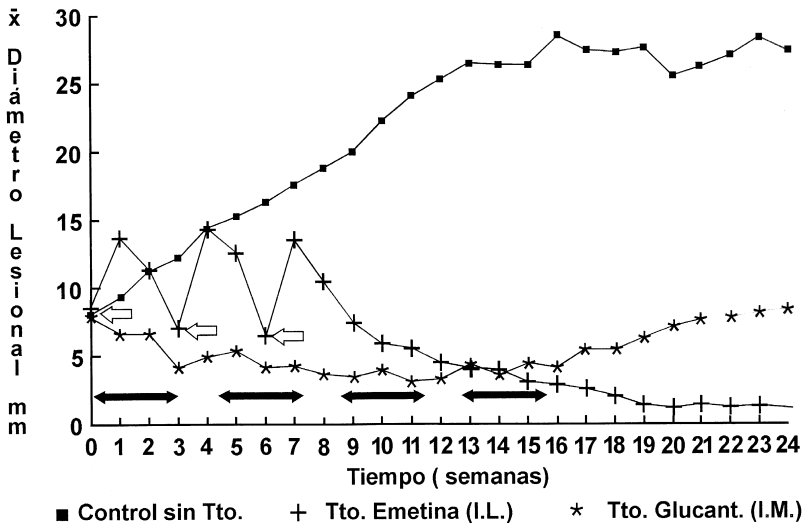


Fig. 1. Efecto del tratamiento con emetina IL y Glucantime® IM, sobre el desarrollo de lesiones en la base de la cola de hámsteres machos inoculados con 4×10^3 amastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Las flechas claras muestran los periodos de tratamiento con el alcaloide, y las oscuras con el antimonial.

gotes de *Leishmania (V.) braziliensis* (ZC) desarrollaron nódulos tangibles entre 30 y 60 días después de la inoculación, sin ocurrir cicatrización espontánea de las lesiones granulomatosas. Las lesiones crecieron progresivamente, hasta un máximo de 45 mm de diámetro, y alcanzaron sus mayores diámetros promedio ($X = 28,6 \pm 8,2$) mm a las 16 semanas de observación, tal como se aprecia en la Fig. 1. La ulceración de las lesiones, y el ulterior deceso de los animales, se produjeron aproximadamente a partir de las semanas 15 a 20 post-infección. Se evaluaron dos hámsteres de este grupo control que no recibió tratamiento, y se detectaron amastigotes viables en sus lesiones dérmicas 305 días post-infección (Tablas I y II).

Efecto de la quimioterapia sobre el tamaño de las lesiones

Glucantime® IM (tratamiento convencional): Los hámsteres tratados por vía IM con este antimonial, mostraron medias de los diámetros semanales relativamente bajas y constantes durante los periodos de administración de la droga ($X_{\text{máx.}} = 6,7 \pm 2,9$) mm. Al suspenderse la inyección de la misma, se reveló un incremento sustancial del tamaño promedio de las lesiones, aunque este último se mantuvo entre $7,8 \pm 1,4$ mm, al comienzo del régimen, y $8,8 \pm 7,6$ mm, al término de las mediciones (Fig. 1). A pesar de que no se logró la cicatrización de todas las lesiones, 3 hámsteres resultaron clínicamente curados hasta los 6 meses de observación, y varios

TABLA I

DETECCIÓN POST-TRATAMIENTO DE *Leishmania (V) braziliensis* EN LESIONES Y/O CICATRICES DE LA BASE DE LA COLA DE HÁMSTERES MACHOS TRATADOS CON EMETINA IL Y GLUCANTIME IM, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE FROTIS DIRECTO, HISTOPATOLÓGICO E INMUNOPEROXIDASA

GRUPO	DÍAS POST-TRATAMIENTO	HÁMSTERES (Nº POSITIVOS/ Nº EXAMINADOS)		
		Frotis	Histopatológico	Inmunoperoxidasa
Sin tratamiento	-	2/2	2/2	2/2
Emetina IL*	174	2/2	1/2	2/2
	180	0/1	0/1	1/1
	230	1/1	1/1	1/1
Glucantime IM*	75	2/2	2/2	2/2

* Hámsteres clínicamente curados.

TABLA II

DETECCIÓN DE *Leishmania (V) braziliensis* MEDIANTE EL CULTIVO EN MEDIO NNN DE BIOPSIAS DE CICATRICES Y/O LESIONES (BASE DE LA COLA), HÍGADO, BAZO Y HEMOCULTIVO DE HÁMSTERES MACHOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON EMETINA IL Y GLUCANTIME IM

GRUPO	DÍAS POST-TRATAMIENTO	HÁMSTERES (Nº POSITIVOS/ Nº EXAMINADOS)		
		Lesión	Hígado	Hemocultivo
Sin tratamiento	-	2/2	0/2	0/2
Emetina IL*	174	0/2	0/2	0/2
Glucantime IM*	180	0/1	0/1	0/1
	230	0/1	0/1	0/1
	75	1/2	0/2	0/2

* Hámsteres clínicamente curados.

alcanzaron cicatrizar sus lesiones durante varios meses, hasta que finalmente recayeron, y presentaron recidivas.

Las diferencias encontradas en la reducción de los diámetros promedio de las lesiones entre los animales tratados con el antimonial y los controles sin tratamiento, resultaron estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Mediante el estudio parasitológico post-tratamiento, se de-

tectaron amastigotes viables en las cicatrices de dos hámsteres curados clínicamente, 75 días después de haberse finalizado el tratamiento quimioterapéutico (Tablas I y II).

Clorhidrato de emetina IL:

Como ya fue indicado en Materiales y Métodos, debido a la irritación que ocasiona el alcaloide a los animales, las medidas durante las primeras semanas de las observaciones correspondieron a los diámetros de las

TABLA III
 ABUNDANCIA PARASITARIA (Nº AMASTIGOTES/CAMPO 400 X) DURANTE
 EL TRATAMIENTO INTRA LESIÓN CON CLORHIDRATO DE EMETINA,
 DE LESIONES DE LA BASE DE LA COLA DE HÁMSTERES MACHOS INOCULADOS
 CON 4×10^3 AMASTIGOTES DE *Leishmania (V) braziliensis*

GRUPO	SEMANAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			
	8	9	10	11
	SEMANAS DESPUÉS DEL 1 ^{er} TRATAMIENTO			
	1	2*	3**	4
Control	200	> 4.000	> 4.000	≈ 2.000
Tratamiento	5	10	0	0

* En la semana 3 se aplicó el 2^{do} tratamiento. se evaluó.

** El periodo después de la 3^{ra} infiltración no

úlceras, abscesos y/o escamocostros. No obstante este efecto traumático o tóxico, el clorhidrato de emetina IL redujo significativamente los diámetros promedio de las lesiones, cuando se compararon con los de los animales que no recibieron tratamiento ($P < 0,01$), se mantuvieron en 12 mm al concluir las 24 semanas de observaciones, y 15 hámsteres permanecieron clínicamente curados (Fig. 1). En lo que respecta a la abundancia parasitaria, los hámsteres controles incrementaron la misma desde 200/400x, en aproximadamente las 8 primeras semanas después de la infección, hasta 2000 amastigotes/campo durante el resto del periodo de observación (Tabla III). Por el contrario, en el grupo tratado IL con el alcaloide, la abundancia de parásitos disminuyó notablemente después de la primera infiltración del fármaco, manteniéndose entre 5 y 10 amastigotes/campo de 400x en las dos primeras semanas después de la primera infiltración, hasta no ser detectables en la

cuarta semana de estudio (Tabla III). Al compararse la acción de la emetina sobre el tamaño de las lesiones por *L. (V) braziliensis*, se observa que el alcaloide es tan eficaz como el antimonial administrado por vía sistémica ($P > 0,05$) (Fig. 1). La evaluación parasitológica reveló la presencia de amastigotes viables en 4 hámsteres 174 (N= 2), 180 (N=1) y 230 (N=1) días, respectivamente, después de finalizados los tratamientos (Tablas I y II).

Efectos del clorhidrato de emetina sobre la ultraestructura de amastigotes de *Leishmania (V) braziliensis*

Es importante acotar que para los efectos del presente trabajo y con el fin de evitar falsos positivos, se descartaron los amastigotes detectados en el interior de las células fagocíticas, por lo que se estudiaron exclusivamente los parásitos extracelulares. Esto permitió un mayor acercamiento a la realidad de la causa-efecto de la quimioterapia sobre la ultraestructura de los parásitos.

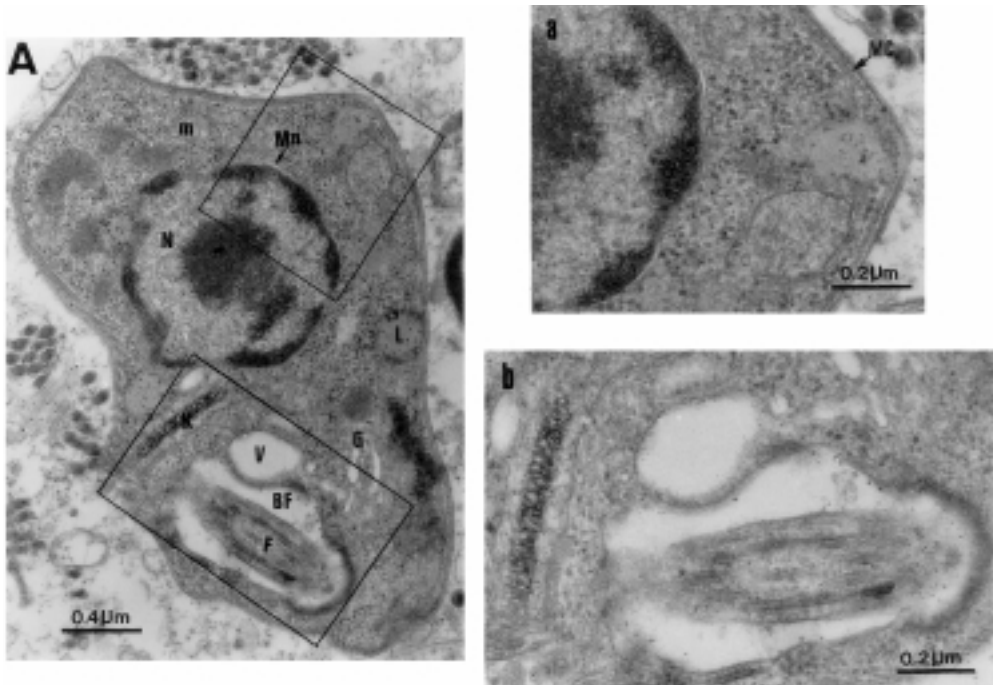


Fig. 2. Amastigotes de *L. (V.) braziliensis* en tejido granulomatoso de lesiones de la base de la cola de hámsteres que no recibieron tratamiento (control sin tratamiento). En la electronografía A se observa un parásito leishmánico con sus componentes ultraestructurales típicos y conspicuos, sin mostrar irregularidades. En los recuadros se detallan a mayor aumento las membranas nuclear y plasmática (a) y el flagelo, bolsa flagelar y el complejo kinetoplasto-mitocondrion (b). Abreviaturas: (MC) membrana plasmática; (N) núcleo; (Mn) membrana nuclear; (m) mitocondria; (K) kinetoplasto; (G) aparato de Golgi; (BF) bolsa flagelar; (F) flagelo; vacuola; (L) gránulo lipídico.

Control sin tratamiento: Los amastigotes presentes en las lesiones granulomatosas de hámsteres que no recibieron quimioterapia, exhibieron la ultraestructura característica del género *Leishmania*, tal como es señalada por Molyneux y Killick-Kendrick (25) y Chang y col. (26). En la Fig. 2 se muestra la ultraestructura típica del parásito, con los amastigotes intactos, bien definidos y conspicuos.

Tratamiento con clorhidrato de emetina II: En los parásitos expuestos a la acción de este alcaloide, el citoplasma aparece desordenado, con gran cantidad de vacuolas pinocíticas (Figs. 3, 4, 5). Núcleos con discontinuidad en su periferia (Fig. 3), o con sus dobles membranas inusualmente distendidas (Fig. 4); el complejo kinetoplasto-mitocondrion se presenta abultado (Fig. 4), o su membrana con pérdida de definición morfológica y/o fragmentada, y con

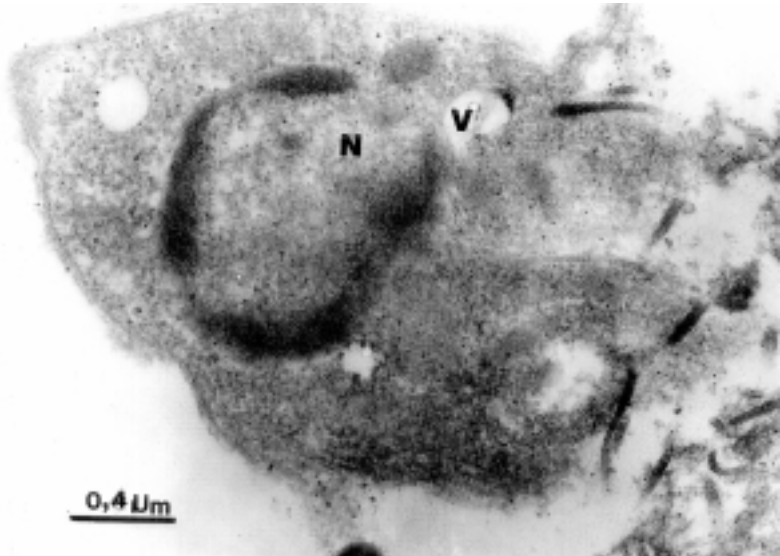


Fig. 3. Electrongrafía de amastigote de *L. (V.) braziliensis* en tejido granulomatoso de lesiones de la base de la cola de hámsteres, después del tratamiento IL con clorhidrato de emetina. El parásito se observa ostensiblemente colapsado, con membranas nuclear y citoplasmática discontinuas, no se detectan otras organelas. Abreviaturas: como en la Fig. 2.

disminución apreciable de su electrondensidad interna (Fig. 5). La bolsa flagelar cuando se observa, exhibe su membrana colapsada, vacuolizada y con pérdida aparente del flagelo (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Después de los brotes epidémicos de leishmaniasis visceral (LV) en el Sur sudanés, y de la resistencia secundaria al Sb^V que se detecta ahora con mayor frecuencia en pacientes con LV y leishmaniasis mucocutánea (LMC), la Organización Mundial de la Salud (OMS) exhortó a la búsqueda de medicamentos anti-*Leishmania* que posean un menor costo de adquisición, una menor to-

xicidad y una mayor eficacia, considerándose que ninguna de las drogas empleadas en la actualidad, tiene potencialmente la etiqueta de "ideal" o de "completamente satisfactoria" (27, 28).

El efecto anti-*Leishmania* de los alcaloides derivados de plantas es un hecho bien conocido y documentado; y en la actualidad se han descubierto numerosos compuestos con un promisorio perfil para el tratamiento de las LT (17, 29). Tal vez el alcaloide con propiedades leishmanicidas más conocido sea la emetina, utilizada durante centurias en la medicina tradicional asiática, antes de ser descubierta por la medicina moderna (17). Como lo documentan Cohen y Livshin (20) y Neal (30), el

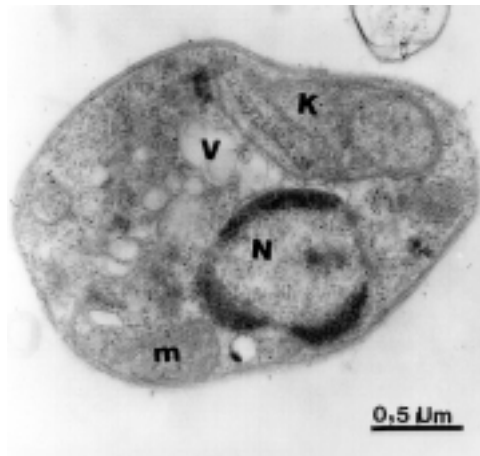


Fig. 4. Efecto del clorhidrato de emetina IL sobre la ultraestructura de amastigote de *L. (V.) braziliensis*, se muestra un parásito con citoplasma intensamente vacuolizado; la membrana nuclear y el complejo kinetoplasto-mitocondrial parecieran estar inusualmente distendida y abultado, respectivamente. Abreviaturas: como en Fig. 2.

primer uso de la emetina en el tratamiento clínico y experimental de las LT se debe a Sinderson (31), y a Neal (32), respectivamente.

Los resultados exhibidos aquí son los primeros estudios hechos sobre la acción de la emetina en el modelo hámster infectado con especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*. Los estudios demuestran que 3 dosis de 1 mg/Kg por vía IL, con un periodo de reposo de 3 semanas entre las mismas, son suficientes para provocar una reducción significativa del tamaño de las lesiones y del número de amastigotes presentes, además de daños irreversibles a nivel ultraestructural, y

cura clínica completa en 15 de 17 hámsteres estudiados. Estas observaciones demuestran que la aplicación de la emetina por vía IL es tan o más eficaz que el tratamiento convencional con Glucantime® IM para producir la cura clínica de los animales. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Neal (21) en ratones infectados con *L. (L) tropica*, y tratados por vía subcutánea con el alcaloide natural, la dehidroemetina y varios de sus enantiómeros. Este autor encuentra la respuesta clínica más efectiva con el clorhidrato de emetina, aun cuando la misma resulta tóxica e irritante para los animales tratados con dosis de 12 mg/Kg durante 5 días continuos. Al respecto, Neal (21) concluye que como en amibiasis, el problema básico en el caso de la emetina está en ponderar la toxicidad de la droga sobre el parásito y la que ella ocasiona al hospedador. En el presente trabajo pareciera que con la implementación del régimen terapéutico estudiado, se podrían separar en gran medida ambas toxicidades, al dosificar con periodos de reposo más prolongados, menor cantidad del fármaco directamente dentro de la lesión. Lo anterior pareciera estar apoyado por los resultados de Cohen y Livshin (20), quienes obtuvieron un 100% de efectividad con la emetina administrada en dosis de 13 a 160 mg una vez cada 15 días, sin que detectaran efectos secundarios. Estas observaciones contrastan con las de Abd-Rabbo (18) y Salem (19) quienes registraron una eficacia alta, pero con marcados efectos se-

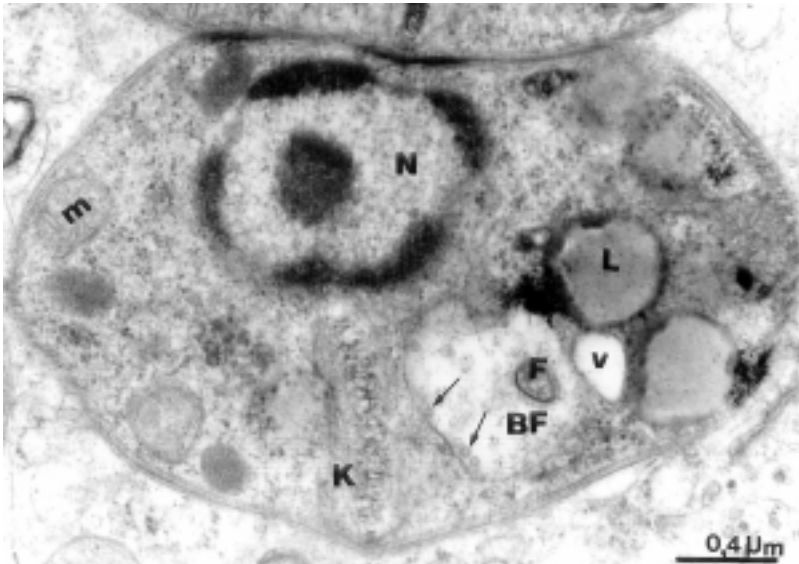


Fig. 5. Electrongrafía de amastigote de *L. (V.) braziliensis* después del tratamiento IL con clorhidrato de emetina, donde se muestra el núcleo al que no se le detecta su doble membrana; bolsa flagelar con su membrana discontinua, y con vacuolas pinocíticas (flechas) y estructura oval que pareciera ser resto del flagelo. Así mismo se observa el complejo kinetoplasto-mitocondrión con disminución de su electrondensidad, y su membrana y ovillo de ADN fibrilar sin unidad morfológica. Abreviaturas: como en Fig. 2.

cundarios, cuando trataron LT del Oriente Medio, con altas dosis (840 mg a 7 g) de dehidroemetina *per os*, en un periodo de 3 a 12 semanas. Obviamente, el efecto secundario observado en estos casos pudo deberse a la gran cantidad del alcaloide suministrada.

Está bien documentado que la emetina y la dehidroemetina actúan en casi todos los tejidos de mamíferos, células de cultivos celulares y en *E. histolytica*. Estas drogas bloquean de forma irreversible la síntesis de proteínas, inhibiendo el desplazamiento del ribosoma a lo largo del RNA mensajero y bloqueando secundariamente la síntesis del ADN

(33, 34, 35, 36), así como también la fosforilación oxidativa mitocondrial (37). Neal (21), registró la acción de la emetina y la dehidroemetina sobre una gran variedad de células, entre ellas *L. (L.) tropica* y *E. histolytica*. Aún cuando no existe información precisa al respecto, es posible sugerir que la efectividad y toxicidad de estas drogas pueda tener un mecanismo de acción en *Leishmania*, parecido al que opera en *E. histolytica*. Es difícil relacionar directamente los mecanismos de acción descritos arriba, con las alteraciones ultraestructurales del alcaloide sobre *L. (V.) braziliensis* observadas en el presente trabajo. Sin em-

bargo, la inhibición de la síntesis de muchas proteínas, incluyendo enzimas, y de la fosforilación oxidativa, deben generarle al parásito un colapso o desorden interno en cascada, con su subsecuente deceso al quedar desactivadas o disminuidas funcionalmente sus rutas metabólicas vitales. Lo anterior, aunque es una consideración teórica, podría ser útil en la búsqueda de la interpretación del fenómeno que de respuesta a la intensa vacuolización, desorden citoplasmático, e irregularidades de las organelas, detectados en los parásitos expuestos a la acción del alcaloide.

La detección de amastigotes viables en los animales experimentales 230 días post-tratamiento, apoya previas observaciones de los autores de este trabajo (24) y la de otros investigadores (38, 39), sobre la necesidad de buscar parásitos en tejidos en vez de medir exclusivamente el tamaño de las lesiones, como método para estimar la efectividad de la quimioterapia en LT experimental.

La detección de amastigotes o parásitos persistentes en animales experimentales y/o pacientes curados clínicamente, y el señalamiento constante de lesiones recidivantes, muchas veces con metástasis a la mucosa nasofaríngea en individuos deficiencia inmunológica, hablan a favor de la idea generalizada de que las leishmaniasis son infecciones oportunistas en individuos inmunocomprometidos (40, 41). A pesar de que no existen evidencias contundentes que permitan descartar que

las recidivas en los pacientes en las áreas endémicas sean debidas a reinfecciones, todas las pruebas apuntan fuertemente hacia la persistencia parasitaria como regla general (42). Esta persistencia de parásitos leishmánicos en pacientes curados clínicamente, o en aquellos que jamás han padecido la infección pero que albergan parásitos (*i.e.*, infecciones ocultas o inaparentes), arroja luces para el análisis y la reflexión acerca de algunos aspectos de la epidemiología y dinámica de transmisión de las leishmaniasis. En primer lugar, esto pareciera justificar la consideración o incriminación del hombre como un posible reservorio intradomiciliario y fuente permanente de transmisión interhumana. Esta aseveración encuentra apoyo en los presentes resultados, donde se demuestra la persistencia de amastigotes de *L. (V) braziliensis* en tejido cicatricial de hámsteres curados clínicamente. Extrapolando lo anterior a las áreas endémicas de activa transmisión de LT en Venezuela, la existencia de especies flebotominas de marcados hábitos antropofílicos y comprobada actividad picadora intradomiciliar y alta susceptibilidad a la infección por *L. (V) braziliensis* (43, 44), se plantea con un alto grado de certeza, la potencialidad de que el hombre pueda ser considerado como un reservorio intradomiciliario.

Como comentario final, es importante señalar que los autores de este trabajo ya ha comenzado a implementar el uso de infiltraciones locales de emetina en pacientes con LT provenientes de varias localidades

del Occidente de Venezuela (resultados no publicados), obteniéndose la cura clínica de los mismos en 2- 3 semanas, con la administración, para nuestra sorpresa, de tan sólo una dosis (0,5 mg/Kg) del alcaloide.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo técnico de P. Salas, A. Trasmonte, V. Medina y J. Yánez. Al Decanato de Investigaciones, UNEFM, Coro, Estado Falcón (Proyecto CTI-96-007), por apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONVIT J., CASTELLANOS P., RONDON A., PINARDI M., URLICH M., CASTES M., BLOOM B., GARCIA L.: Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *The Lancet* 1987; 21:401-404.
2. BONFANTE-GARRIDO R., MELÉNDEZ E., BARROETA S., MEJIA DE ALEJOS M., MOMEN H., CUPOLILLO E., MC MAHON -PRATT D., GRIMALDI G.: Cutaneous leishmaniasis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. *Trans R Soc Trop Med & Hyg* 1992; 86:141-148.
3. D'SUZE C., GARCIA C.: Epidemiología de la leishmaniasis. *Dermat Venez* 1993; 31 (Suppl 2): 4-11.
4. SCORZA J., MEDINA R., PEREZ H., HERNÁNDEZ A.: Leishmaniasis in Venezuela. En: Chang K., Bray R. Eds.. *Human parasitic disease. Leishmaniasis*. Amsterdam: Elsevier., 1985. Vol. 1. p. 283-296.
5. KINNAMON K., STECK E., LOIZEAUX P., CHAPMAN W., WITS V., HANSON W.: Leishmaniasis: in search of new chemotherapeutic agents. *Am J Vet Res* 1980; 41:405-407.
6. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD.: Control of the leishmaniasis. Geneva. Suiza: Technical report series N° 793; 1990.
7. CHULAY J., SPENCER H., MUGAMBI M.: Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:702-709.
8. BRYCESON A.: Therapy in man. En: Peters W., Killick-Kendrick R. Eds. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press., 1987. Vol. II. p. 847 - 907.
9. GROGL M., THOMASON T., FRANKE E.: Drug resistance in leishmaniasis: it's implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:117-126.
10. OUELLETTE M., PAPADOPOULOU B.: Mechanisms of drug

- resistance in *Leishmania*. *Parasitology Today* 1993; 9: 150-153.
11. MARSDEN P., JONES T.: Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. En: Chang K., Bray R. Eds. Human parasitic disease. Leishmaniasis. Amsterdam: Elsevier., 1985. Vol. 1. p. 183 - 198.
 12. MARSDEN P.: Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Tres Braços. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:485-487.
 13. JOUIFEE D.: Cutaneous leishmaniasis from Belize- treatment with ketoconazole. *Clin Exp Dermatol* 1986; 11:62-68.
 14. PAREEK S.: Combination therapy of sodium stibogluconate and rifampicin in cutaneous leishmaniasis. *Int J. Dermatol* 1983; 23:70-71.
 15. YÉPEZ J., SCORZA J.: Intralesional chemotherapy with meglumine plus lidocaine of localized cutaneous leishmaniasis in Trujillo state, Venezuela. *Bol Dir Malariol & San Amb* 1995; 35:71-75.
 16. TORRES R., BARROETA S.: Tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada con infiltraciones perilesionales de Glucantime y lidocaina. *Kasmera* 1999; 27: 129 - 160.
 17. IWU M., JACKSON J., SHUSTER B.: Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today* 1994; 10: 65-68.
 18. ABD-RABBO H.: Dehydrometine in leishmaniasis (oriental sore). *J Trop Med Hyg* 1966; 69:171-174.
 19. SALEM H.: The treatment of cutaneous leishmaniasis with oral dehydroemetine. *Trans R Soc Trop Med* 1967; 61:776-780.
 20. COHEN H., LIVSHIN R.: Treatment of leishmaniasis nodosa (oriental sore) with intralesionally injected emetine hydrochloride. *J Amer Acad Dermatol* 1987; 17: 595-599.
 21. NEAL R.: Effect of emetine and related compounds on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1970; 64:159-165.
 22. BRAY R., GARHNAM P.: The Giemsa-colophonium method for staining protozoa in tissue sections. *Indian J Malar* 1962; 16:153.
 23. SELLS P., BURTON M.: Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin tissue by immunoperoxidase staining. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 461-468.
 24. YEPEZ J., CAZORLA D., SÁNCHEZ DE MIRT A., AÑEZ N., LUGO DE YARBUH A.: Effect of intralesional treatment with lidocaine and Glucantime® in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Bol Dir Malariol & San Amb* 1999; 39:10-20.
 25. MOLYNEUX D., KILLICK-KENDRICK R.: Morphology, ul-

- trastructure and life cycle. En: Peters W., Killick-Kendrick R. Eds. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press., 1987. Vol. I. p. 121 - 176.
26. CHANG K., FONG D., BRAY R.: Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: Chang K., Bray R. Eds. Human parasitic disease. Leishmaniasis. Amsterdam: Elsevier., 1985. Vol. 1. p. 1 - 30.
 27. UNDP/WORLD BANK/WHO.: TDR News. N° 34. Geneva. Suiza; 1990.
 28. OLLIARO P., BRYCESON A.: Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. Parasitology Today 1993; 9:323-328.
 29. FOURNET A., BARRIOS A., MUÑOZ V., HOCQUEMILLER R., CAVE A., BRUNETON J.: 2-sustituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:859-863.
 30. NEAL R.: Experimental chemotherapy. En: Peters W., Killick-Kendrick R. Eds. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press., 1987. Vol. II. p. 793 - 845.
 31. SINDERSON H.: Emetine hydrochloride in the treatment of oriental sore. Trans R Soc Trop Med Hyg 1924; 18:108-110.
 32. NEAL R.: Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: *Leishmania tropica* infection in mice. Ann Trop Med Parasitol 1964; 58:420-430.
 33. HUANG T., GROLLMAN A.: Novel inhibitors of protein synthesis animal cells. Fed Proc 1970; 29:609.
 34. JOHNSON R., KWAN S., DONAHUE J., JONDORF W.: Effects of (-) emetine on protein synthesis in regenerating rat liver. Fed Proc 1970; 29:609.
 35. ENTNER N.: Emetine binding to ribosomes of *Entamoeba histolytica*- inhibition of protein synthesis and amebicidal action. J Protozool 1979; 26: 324-328.
 36. GOLDSMITH R.: Tratamiento de la amibiasis. En: Katzung B. Ed. Farmacología Básica y Clínica. D.F. México: Editorial El Manual Moderno S.A., 1987. p. 649 - 660.
 37. DUBICK M., YANG W.: Effects of chronic emetine treatment on mitochondrial function. J Pharm Sci 1981; 70:343-345.
 38. DE ROSSELL R., ROSSELL O., DE JESUS R., RODRIGUEZ A.: Thermotherapy v. antimonials: what happens after the healing of cutaneous leishmaniasis lesions? Ann Trop Med Parasitol 1993; 87:23-30.
 39. TRAVI B., MARTINEZ J., ZEA A.: Antimonial treatment of hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*: assessment of parasitological cure with different therapeutic schedules. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 85:567-569.
 40. AEBISHER T.: Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites? Parasitology Today 1994; 10:25-28.

41. ALVAR J.: Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitology Today* 1994; 10:160-163.
42. SARAVIA N., WEIGLE K., SEGURA I., HOLMES S., PACHECO R., LABRADA L., GONCALVES A.: recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection- reactivation o reinfection? *The Lancet* 1990; 336:398-402.
43. SCORZA J.: Protocolo para investigación epidemiológica de leishmaniasis tegumentaria en Venezuela. *Bol Dir Malariol & San Amb* 1988; 25:83-90.
44. ROJAS E., SCORZA J.: Xenodiagnóstico con *Lutzomyia youngi* en casos venezolanos de leishmaniasis cutánea por *Leishmania braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84:29-34.