

Comparación de los efectos terapéuticos de la mezcla de promastigotes + BCG, antígenos purificados de amastigotes y el glucantime® en un área endémica de leishmaniasis cutánea, en Guatire, Edo. Miranda, Venezuela

Drs. José A O'Daly Carbonell, Humberto Spinetti, María Beatriz Rodríguez, Lourdes Acuña, Luis María Castillo, Leyla Zambrano, Tania Ovalles, Carlos Zamora

Centro de Microbiología y Biología Celular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) Apartado 21827, Caracas 1020A, Venezuela

RESUMEN

En la región hiperendémica de "La Planta" en Guatire, Edo. Miranda, Venezuela, hemos encontrado que el 23,2% de los 56 pacientes tratados con una mezcla de promastigotes muertos por calor + BCG no muestran remisión clínica de la leishmaniasis cutánea.

El número de inoculaciones alcanzó a $5,7 \pm 2,7$ en los que remitieron de la enfermedad en un lapso de $8,6 \pm 6,7$ meses y $9,3 \pm 4,5$ inoculaciones en los que no curaron de las lesiones leishmánicas. Estos últimos, necesitaron $45,8 \pm 33,2$ dosis de Glucantime® para obtener la regresión de las lesiones, aproximadamente el doble de lo necesario en los pacientes con leishmaniasis que no recibieron previamente el tratamiento con promastigotes auto-clavados + BCG.

El 39,5% de los pacientes tratados con promastigotes muertos por calor + BCG que tuvieron remisión clínica de la lesión leishmánica presentaron recidivas de la enfermedad en un lapso de $48,4 \pm 30,5$ meses ameritando 33 ± 11 dosis del antimonial pentavalente para su tratamiento. De estos pacientes 3 han presentado segundas recidivas tratadas en igual forma.

El 100 % de los pacientes tratados con Glucantime® han tenido remisión clínica de la enfermedad con un promedio de 29 ± 11 dosis en un lapso de $2,5 \pm 1,4$ meses. En este grupo el 12,5% ha presentado recidivas de la

enfermedad a los $32,6 \pm 38,22$ meses de su aparente remisión clínica.

El 100% de los pacientes tratados con proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias han presentado remisión clínica de la enfermedad con $8,1 \pm 6,5$ dosis en un lapso de $2,3 \pm 1,9$ meses sin que hasta ahora hayan aparecido recidivas de la enfermedad en 24 meses de observación.

El tiempo de remisión de las lesiones en los pacientes tratados con promastigotes muertos por calor + BCG fue mayor ($p < 0,0001$) que el observado en los pacientes tratados con Glucantime®, proteínas de amastigotes o en las personas que presentaron remisión espontánea de la enfermedad.

Palabras claves: Leishmaniasis cutánea. Inmunoterapia. Quimioterapia. Promastigotes. BCG. Amastigotes. Recidivas.

SUMMARY

In "La Planta" a hyperendemic zone for leishmaniasis in Guatire, Miranda State, Venezuela, we have found 23.2% individuals, without clinical remission of the disease in a group of 56 patients with cutaneous leishmaniasis treated with killed promastigotes+BCG.

The patients with clinical remission of the disease needed 5.7 ± 2.7 injections of promastigotes+BCG in 8.6 ± 6.7 months, while the patients without remission re-

ceived 9.3 ± 4.5 inoculations of the same mixture.

The patients without clinical remission of the disease after treatment with promastigotes+BCG, needed 45.8 ± 33.2 doses of Glucantime® for clinical cure, twice as much as patients with leishmaniasis that never received the mixture of promastigotes + BCG.

39.5% of patients treated with promastigotes + BCG that had clinical remission of lesions, presented a relapse of cutaneous leishmaniasis after 48.4 ± 30.5 months. These patients needed 33 ± 11 doses of Glucantime® to control the disease. Three of these patients had second new relapses of cutaneous leishmaniasis.

100% of patients treated with Glucantime® had clinical remission of the disease with 29 ± 11 doses in 2.5 ± 1.4 months. In this group, 12.5% patients presented relapses of the disease after 32.6 ± 32.22 months of clinical cure.

100% of patients treated with proteins from amastigotes of several *leishmania spp.* showed clinical remission of the disease with 8.1 ± 6.5 doses in 2.3 ± 1.9 months with no relapses of leishmaniasis, in 24 months of observation.

The time of clinical remission of lesions was higher in patients treated with promastigotes+BCG ($p < 0.001$) than in patients treated with Glucantime®, amastigote proteins or patients with spontaneous clinical remission of the disease.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis. Immunotherapy. Chemotherapy. Promastigotes. BCG Amastigotes. Relapses.

INTRODUCCION

El uso de métodos basados en una terapéutica inmunitaria para el tratamiento de diversos procesos infecciosos no es nuevo. En 1902 Wright empleó como inmunoterapia una vacuna preparada a base de estafilococos para el tratamiento de la furunculosis y del acné (1).

Di Cristina y Caronia en 1912, trataron la infección por el parásito leishmánico con una vacuna preparada con promastigotes muertos por calor, inyectándoselos a 7 pacientes con leishmaniasis visceral sin observar mejoría en la evolución clínica de la enfermedad (2).

Row en 1912, inyectó promastigotes de un cultivo de *Leishmania major*, muertos por calor, a 3 pacientes con leishmaniasis cutánea los cuales curaron completamente (3). Estas experiencias las repite Dubovsky en 1943 en 35 pacientes con leishmaniasis cutánea tratados de manera similar,

reportando 58 % de curación y 34% de reducción en el tamaño de las lesiones leishmánicas (4).

A los trabajos anteriores no se les prestó atención y fueron marginados. Los investigadores perdieron el interés por el tratamiento de los pacientes con productos de acción inmunitaria debido a que Gaspar Vianna en 1912, publica la curación de las lesiones clínicas al tratar la leishmaniasis cutánea con tártaro emético (tartrato de antimonio y potasio) entronizándose en la clínica el tratamiento quimioterápico con antimoniales hasta el día de hoy (5).

Sin embargo, esta quimioterapia a veces presenta toxicidad, no puede usarse en mujeres embarazadas y está contraindicada en pacientes con enfermedad renal o cardíaca. Además, los parásitos leishmánicos pueden presentar resistencia a los antimoniales (6,7).

El estudio de la leishmaniasis en animales experimentales ha permitido entender numerosos hechos importantes sobre la patogenia y evolución clínica de la enfermedad.

El éxito en la lucha contra la infección por el parásito *Leishmania* en todas las cepas de ratones depende del desarrollo de inmunidad celular en el animal infectado, proceso complejo, responsable de la destrucción de los amastigotes intracelulares presentes en los tejidos (8).

Los ratones BALB/c susceptibles a la enfermedad, poseen un sistema inmunitario incapaz de controlar la infección por *Leishmania major*, pues sus macrófagos no pueden detener la proliferación intracelular de los parásitos en el sitio de la inoculación o en las vísceras infectadas.

Los ratones de la cepa BALB/c inyectados con amastigotes de *Leishmania trópica* en la almohadilla plantar desarrollan una infección masiva con inflamación local, adenopatías regionales, hepato-esplenomegalia, diseminación de los parásitos en el organismo y muerte del animal.

Esta progresión de la enfermedad puede explicarse por: 1- Los macrófagos no responden a las linfoquinas inductoras de los mecanismos de protección que destruyen a los parásitos in vitro (9,10). 2- Las células adherentes (macrófagos) de los bazo de los ratones infectados con *Leishmania major* suprimen la respuesta inmunitaria de los linfocitos normales (11). 3- Los linfocitos de los animales infectados en respuesta a mitógenos o antígenos del parásito in vitro producen una cantidad menor de linfoquinas activadoras de macrófagos (12). 4- Los ratones BALB/c generan una población

de células T supresoras durante la infección leishmánica (12).

En síntesis, por una parte los linfocitos del animal infectado en respuesta a diversos antígenos o mitógenos tienen una producción deficiente de linfoquinas capaces de inducir la activación de macrófagos y por la otra existe una respuesta defectuosa de los macrófagos a las linfoquinas, por lo cual estas células no pueden destruir los parásitos que albergan en su citoplasma.

Una forma de aumentar la respuesta inmunitaria para obviar estos defectos en los macrófagos es usando agentes inmuno-estimuladores no específicos, como el bacilo de Calmette-Guerin (BCG).

En tal sentido se ha visto que la infección de ratones con BCG induce una hiperplasia del sistema fagocítico (13) mediante la activación de los macrófagos capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias intracelulares (14).

Adicionalmente, los ratones tratados con BCG muestran un aumento en la magnitud y en la duración de la respuesta de sensibilidad tardía inducida por la inmunización con eritrocitos de carnero. Este fenómeno se observa aun con dosis de eritrocitos que inducen una respuesta inmunitaria humoral, con un título alto de anticuerpos y una respuesta de inmunidad celular baja a juzgar por la reacción de sensibilidad tardía la cual es casi nula (15).

En 1977 Weintraub y Weinbaum observaron que al administrar BCG a ratones BALB/c (1×10^7 BCG vivos) por vía i.v., antes de la infección con 50 000 amastigotes de **Leishmania trópica** se producía una reducción moderada en la severidad de la enfermedad cutánea, en el grado de visceralización del parásito y en la mortalidad de los ratones, en comparación a los animales que no habían recibido BCG. Es de hacer notar que en estos ratones siempre se encontraron leishmanias en los ganglios linfáticos que drenan la lesión, tanto en los animales tratados con BCG como en los controles (16).

Grimaldi y col. en 1980 encuentran resultados diferentes a Weintraub y Weinbaum, pues al tratar a los ratones susceptibles, 3 meses después de la infección por **L mexicana** con 5×10^8 BCG i.p. seguido 10 días después de 8 aplicaciones semanales de 6×10^5 BCG intralesional con escarificación en patrón de malla mediante aguja hipodérmica, observaron un crecimiento acelerado de las lesiones

leishmánicas primarias, en comparación con los controles y 3 de los 8 animales tratados presentaron metástasis cutáneas a distancia 8 meses después de la infección (17).

En 1987, Fortier y col. publican que los amastigotes aislados de las lesiones de ratones infectados, administrados en una mezcla junto con BCG vivo en la almohadilla plantar, protegen a los ratones BALB/c de la diseminación metastásica de los parásitos a las vísceras y por lo tanto de una infección letal sistémica. Esta mezcla de amastigotes + BCG también induce un 50% de disminución en el tamaño de las lesiones cutáneas, 12 semanas después de la infección, efecto mucho más pronunciado en ratones de la cepa P/J que en BALB/c (18).

Estos mismos autores observaron que al inducir una respuesta inmunitaria sistémica contra BCG en los ratones, 10 días antes de la inoculación de la mezcla de amastigotes + BCG en la almohadilla plantar, los animales muestran protección total contra la enfermedad cutánea, desarrollando también inmunidad contra la reinfección. Sin embargo, en estos experimentos al igual que en los de Weintraub y Weinbaum (16) siempre se encontraron parásitos leishmánicos abundantes en los ganglios linfáticos que drenan el área de la lesión cutánea (18).

La vacunación con BCG induce también una reacción de Mitsuda positiva en la mayoría de las personas previamente negativas, por lo cual se propuso en el pasado su uso para realizar programas preventivos contra la lepra, pues el bacilo de la lepra no se ha podido cultivar en el laboratorio y aparentemente tiene poca inmunogenicidad.

Hanks y Fernández en 1956, usando el modelo experimental de la lepra murina en ratas Wistar susceptibles a la infección lepromatosa por micobacterias, encontraron que el **Mycobacterium leprae murium** inyectado conjuntamente al BCG por vía subcutánea e intracutánea, protegía significativamente contra la infección por **M leprae murium** producida por la administración intracutánea del bacilo en una suspensión testicular 63 días después de la inmunización. La severidad de la enfermedad fue seguida mediante el peso promedio de los lepromas en el sitio de la inoculación y por el porcentaje de sitios de inoculación por raspado de la piel que se habían transformado en lepromatosos. Los valores dieron, en animales inmunizados con la mezcla de **M leprae murium** + BCG y luego infectados, 0,2g y 0,1%, respectivamente, mientras en los

controles estos valores alcanzaron 2,7g y 1,1% (19).

Posteriormente Convit y col en 1974, aplican esta idea en seres humanos pensando que la aparición clínica de la lepra se debe a la ausencia de una respuesta de células T antígeno-específica contra **Mycobacterium leprae** en los individuos infectados, la cual podría inducirse mediante un agente inmunestimulador como el BCG.

Estos autores, al inyectar **M leprae** muertos en las lesiones dérmicas de los pacientes leprosos, encuentran granulomas de macrófagos indiferenciados llenos de bacilos que persisten varios meses, mientras que al inyectar BCG o una mezcla de BCG + **M leprae**, observan granulomas inmunitarios donde las micobacterias fueron eliminadas a los 21 días en el caso de inyectar solamente BCG, o a los 30 días después de la inyección con la mezcla de ambas micobacterias (20).

Convit y col. en 1986, usando la mezcla de ambas micobacterias como tratamiento en varios cientos de pacientes con lepra lepromatosa, lepra indeterminada y en contactos Mitsuda-negativos, encuentran cambios inmunológicos favorables, con mejoría de los síntomas en una proporción sustancial de los pacientes así tratados (21).

Sin embargo, Convit y col. en 1992 publican un ensayo de campo, comparando el BCG solo con la mezcla de BCG+**Mycobacterium leprae** inyectados por vía intradérmica en la espalda del paciente con un seguimiento clínico de 5 años. En este ensayo encontraron que la mezcla de ambas micobacterias no ofrece una protección mejor al paciente con lepra al compararla con el BCG solo. El análisis retrospectivo de los datos sugiere que el BCG usado solo, confiere una protección substancial contra la lepra (eficiencia de la vacuna BCG: 56%, límites de confianza del 95% de 27-74%), observando además que varias dosis de BCG mejoran la respuesta inmune y ofrecen una protección adicional (22).

En 1987 Convit y col. usan como tratamiento para la leishmaniasis cutánea la mezcla constituida por promastigotes de cultivo muertos por calor unidos al BCG vivo, administrados por vía subcutánea. Los promastigotes de la mezcla pertenecían a una cepa de **Leishmania mexicana** aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa, cultivada en medio líquido tres-antibiótico de la GIBCO®, suplementado con 20% de suero fetal bovino. Los parásitos se llevaron a una concentración

de $6,4 \times 10^8$ promastigotes en 0,4 ml de solución salina por dosis y se inactivaron por calor mediante autoclave (23).

Los autores precedentes reportan, en 94 pacientes con leishmaniasis cutánea, un 94% de curación a las 32 semanas en 52 pacientes tratados con la mezcla de promastigotes + BCG, similar a lo obtenido en 42 pacientes tratados con Glucantime® (23).

Mayrink y col. en Brasil en 1992, han usado el tratamiento con promastigotes muertos pero sin añadirle BCG en 62 pacientes con leishmaniasis cutánea inyectándoles una vacuna polivalente desarrollada por ellos, constituida por promastigotes de 5 cepas de leishmanias, preparados en dos formas: la mitad sonicados, la otra mitad de los parásitos indemnes, y luego toda la mezcla resuspendida en solución tamponada fosfato-meritolate 1:10 000 a una concentración final de 240 µg/ml, sin ningún tipo de adyuvante (24).

De los 62 pacientes tratados con la vacuna polivalente el 76% (47/62) fue considerado curado. El 24% (15/62) no respondió al tratamiento y recibieron Glucantime®.

En trabajos anteriores hemos encontrado que las leishmanias pueden ser cultivadas en la forma intracelular o amastigote usando un medio libre de células, creado en nuestro laboratorio (25,26). Posteriormente demostramos que estos parásitos tratados con inhibidores de enzimas proteolíticas protegían al animal experimental contra la infección leishmánica (27,28). Finalmente, aislamos de estos amastigotes, 8 proteínas capaces de proteger contra la leishmaniasis cutánea, a seres humanos residentes en áreas tanto endémicas como hiperendémicas de la enfermedad (29).

En este trabajo presentaremos los resultados sobre la remisión clínica de las lesiones en pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias a fin de compararlos con el efecto quimioterápico del Glucantime®. También demostraremos que la mezcla de promastigotes + BCG no es un tratamiento eficaz para el control de la leishmaniasis cutánea en los seres humanos, pues un porcentaje alto de los pacientes tratados no muestran remisión clínica de las lesiones. En los pacientes con remisión clínica, un tiempo después de la cicatrización de las úlceras leishmánicas aparecen recidivas de la enfermedad. Por otra parte, la inyección de promastigotes+BCG presenta efectos secundarios indeseables en el área

de la inoculación y numerosos pacientes muestran cicatrices queloideas en el área de la úlcera primaria.

MATERIALES Y METODOS

Parásitos

Se usaron las siguientes especies de leishmanias: **L. amazonensis** (La: IFLA/BR/67/PH8); **L. venezuelensis** (Lv : MHOM/VE/80/H16); **L. brasiliensis** (Lb : MHOM/VE/75/H27); y **L. chagasi** (Lch: MHOM/BR/74/PP75). Los distintos parásitos fueron cultivados en Medio Sintético Enriquecido (MSE) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y cada cepa incubada a la temperatura particular de transformación a la forma amastigote como hemos publicado con anterioridad (25,26).

Cada cepa no es usada para la vacuna cuando ha sido cultivada durante más de 30 repiques sucesivos, ya que los parásitos pierden virulencia, así como también la capacidad para transformarse en amastigotes. Por lo tanto, una vez cumplidos los 30 pasajes en cultivo, las cepas de leishmanias son aisladas de nuevo de la almohadilla plantar de ratones BALB/c donde son mantenidas in vivo mediante repiques sucesivos cada 3-4 semanas. El nuevo aislamiento se realiza en MSE suplementado con 5% (v/v) de SFB como ya hemos publicado (25,26).

Preparación de la vacuna

Una vez que los parásitos en el cultivo llegaron a la fase estacionaria de crecimiento en la forma amastigote (25,26) se centrifugaron a 800 xg por 20 min a 4°C y se lavaron 2 veces con solución salina tamponada (SST: 0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,4) mediante centrifugaciones sucesivas. Posteriormente se suspendieron en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con 150 µg/ml de tosil-L-lisina-clorometil-cetona (TLCK) a 30°C por 3 días, lo cual asegura la muerte de todos los parásitos como hemos publicado con anterioridad (27,28). A continuación los parásitos se centrifugaron a 12 100 x g por 10 min a 4°C en una centrífuga Sorvall y se lavaron dos veces con SST mediante centrifugaciones sucesivas. Seguidamente se incubaron en MEM suplementado con 0,12% de NONIDET-P-40 (NP40 Sigma) por 30 min a 4°C, usando métodos ya publicados (30,31). Posteriormente se centrifugaron a 12 100 x g por 10 min a 4°C

en una centrífuga Sorvall lavándose dos veces con SST. Luego se resuspendieron en SST para ser sonicados por 3 min a 4°C determinándose el contenido proteico por el método de Lowry y col. (32). Seguidamente se les añadió alúmina (hidróxido de aluminio, gel de baja viscosidad "Rehydrigel"[®], Reheis Inc, New Jersey) a una concentración de 1 ml /mg de proteína de cada una de las cepas de leishmanias ya nombradas, las cuales fueron añadidas a partes iguales a fin de obtener una concentración final de 1000 µg/ml de antígeno leishmánico.

La vacuna es administrada en dosis semanales de 500 µg la primera dosis y luego 800 µg en las dosis subsiguientes por vía intramuscular en la región deltoidea.

En cada una de las instancias de la preparación de la vacuna se tomaron muestras para el control de la esterilidad a fin de descartar cualquier contaminación. Las muestras se sembraron en MSE suplementado con 5% de SFB y luego se incubaron por 72 h a 37°C. También, una vez envasada en el frasco ampolla multidosis, ya lista para uso se tomaron alícuotas y se sembraron en placas de agar conteniendo 12,5% (p/v) de bacto peptona (Difco); 12,5% (p/v) de extracto de levadura (Becton Dickinson); 37,5% (p/v) D(+) glucosa monohidratada (Merck) y 37,5% (p/v) de BBL agar (Becton Dickinson). Las muestras se incubaron a 37°C por 48 horas para descartar bacterias de crecimiento rápido y por 3 semanas a 26°C para descartar bacterias de crecimiento lento y hongos. Toda vacuna contaminada con hongos o bacterias era desechada.

Pacientes analizados

Los vecinos de la zona de "El Ingenio" se dirigieron a nuestro laboratorio en el IVIC, pues estaban interesados en recibir la vacuna contra la leishmaniasis que nosotros hemos desarrollado y aplicado en otras zonas cercanas a Guatire, Edo. Miranda, Venezuela (29).

La zona de "El Ingenio", situada en los alrededores de Guatire a 35 km por carretera hacia el este de Caracas es una comunidad rural dispersa donde la leishmaniasis es hiperendémica como ya lo hemos publicado con anterioridad (29). En esta comunidad existe una prevalencia de 162‰ y una incidencia de casos de leishmaniasis de 5,7 - 132,1‰ desde 1972 a 1994.

Para detectar los casos de leishmaniasis se realizaron visitas casa por casa. Se estudiaron 168

personas las cuales se agruparon en cuatro categorías diferentes, según el tratamiento recibido: 1- Pacientes que recibieron una mezcla de promastigotes + BCG por vía s.c. (n = 56) en la Medicatura rural de Aaira, Edo. Miranda, o en el Instituto de Biomedicina, Hospital Vargas de Caracas; 2- Pacientes tratados con Glucantime® (n = 40) en el Instituto de Medicina Tropical Universidad Central de Venezuela, Caracas. 3- Pacientes tratados con nuestra vacuna (n = 29) constituida por proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias administrada por vía i.m.; 4- Pacientes que curaron espontáneamente de la enfermedad (n = 40).

El seguimiento de todos los casos se realizó mediante visitas domiciliarias cada 15 días, elaborando la historia clínica en cada paciente, régimen que aún continúa vigente al momento de escribir este trabajo (septiembre 1995).

Intradermoreacción

La intradermoreacción (IDR) se realizó inyectando por vía intradérmica 4 µg de antígeno polivalente en 0,1 ml de SST. El antígeno usado tiene la misma composición del empleado en la preparación de la vacuna con las cuatro especies de leishmanias ya mencionadas, envasado en frasco-ampolla multidosis a la concentración de 40 µg/ml de proteína en SST, al cual se le practican las mismas pruebas de esterilidad ya descritas para el caso de la vacuna.

La cuantificación de la reacción intradérmica se realizó dibujando con un bolígrafo el área rojiza hasta el borde del nódulo que aparece a las 48 horas después de la inoculación del antígeno, en las personas con reacción positiva. Este dibujo sobre la piel es luego transferido a papel milimetrado, frotando el reverso del papel con un algodón humedecido en alcohol. Luego se cuentan los cuadritos del papel milimetrado dentro del área dibujada por el nódulo del paciente para cuantificar el área de la reacción y se estima el diámetro ($d=2r$) de la misma usando la fórmula para el cálculo del área del círculo: $A= (r^2)$. Toda reacción con un diámetro mayor de 5 mm a las 48 horas de la inoculación del antígeno es considerada positiva. Cada papel milimetrado es guardado en la historia clínica del paciente.

Diagnóstico de leishmaniasis

Todos los pacientes con sospecha clínica de la

enfermedad fueron analizados mediante ELISA, "Immunobloting" e intradermoreacción con antígenos específicos de 4 especies de leishmanias, como hemos publicado con anterioridad (31). También se les tomó biopsia y frotis por aposición a fin de demostrar los parásitos con el microscopio de luz. Paralelamente, se tomó biopsia por aspiración para el cultivo de las leishmanias en medios de cultivo desarrollados en nuestro laboratorio (25,26) y para inoculación en la almohadilla plantar de ratones BALB/c.

Criterio de curación

Se consideró como remisión clínica efectiva de la infección leishmánica la involución total de lesiones ulceradas previamente diagnosticadas mediante la presencia de parásitos las cuales fueron substituidas por tejido de cicatriz y que no se hayan reactivado en un período menor de 6 meses después de la cicatrización.

RESULTADOS

El grupo de pacientes tratados con la mezcla de promastigotes+BCG está conformado por 56 personas de las cuales el 53% pertenece al sexo masculino y el 47% al sexo femenino. En su mayoría (77%) son menores de 25 años de edad (Cuadro 1).

Cuadro 1

Evolución de los pacientes tratados con promastigotes + BCG distribuidos según sexo y grupos de edad

		REMISION	NO REMISION
MASCULINOS	n=30	21 (70,0%)	9 (30,0%)
FEMENINOS	n=26	22 (84,6%)	4 (15,4%)
p=0,22381			
< 25	n=43	37 (86,1%)	6 (13,9%)
>25	n=13	6 (46,2%)	7 (53,8%)
p=0,00624			
Total	n=56	43 (76,8%)	13(23,2%)

El valor de p se calculó por medio de la prueba exacta de Fisher, comparando las cuatro variables en los pacientes con y sin remisión clínica en los distintos sexos y grupos de edad.

De todo el grupo, el 76,8% mostró remisión clínica de las lesiones mientras que en el 23,2%, las úlceras leishmánicas persistieron (Cuadro 1) a pesar de haber recibido en promedio $6,6 \pm 3,5$ inoculaciones de promastigotes+BCG, número que aumenta a $9,3 \pm 4,5$ inoculaciones en los no curados en comparación a las $5,7 \pm 2,7$ inoculaciones en los pacientes con remisión clínica de la enfermedad (Cuadro 2). En la Figura 1 observamos una úlcera persistente de 2 años de evolución a pesar de 8 inoculaciones de promastigotes+BCG. Fue tratado



Figura 1. Paciente masculino de 18 años de edad con una úlcera leishmánica en el dedo meñique de la mano izquierda, activa desde junio de 1993 a pesar de haber recibido 8 inoculaciones sucesivas de promastigotes+BCG por 2 años en la región deltoidea sin obtener remisión de la lesión hasta junio de 1995 cuando fue tratado con proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias, curando en 2 meses.

con proteínas de amastigotes en Junio de 1995, remitiendo en dos meses. Así mismo observamos dos úlceras leishmánicas tratadas con 12 inoculaciones de promastigotes+BCG que persistieron durante 1 año después de lo cual fueron tratadas con 40 dosis de Glucantime® (Figura 2).



Figura 2. Paciente masculino de 19 años con dos úlceras leishmánicas de aparición simultánea en 1992, tratadas con 12 inoculaciones de promastigotes+BCG, persistiendo las lesiones por un lapso de 1 año, después de lo cual recibió 40 dosis de Glucantime®, remitiendo las lesiones.

Cuadro 2

Comparación del número de inoculaciones, tiempo de remisión clínica y dosis de Glucantime después de la administración de promastigotes + BCG distribuidos según sexo y edad

		Total	Número Inoculaciones		Tiempo de remisión Pro+ BCG	Dosis Glucantime pacientes sin remisión post pro+ BCG
			Remisión	No remisión		
MASCULINOS	n=30	$7,1 \pm 4,0$	$6,0 \pm 2,8$	$9,7 \pm 5,1$	$9,6 \pm 7,6$	$55,0 \pm 49,4$
FEMENINOS	n=26	$5,9 \pm 2,7$	$5,5 \pm 2,6$	$8,0 \pm 2,8$	$7,1 \pm 5,2$	$43,5 \pm 28,1$
			p=0,1878 ¹	p=0,5471 ¹	p=0,5501 ¹	p=0,2108 ¹
< 25	n=43	$6,4 \pm 3,4$	$5,8 \pm 2,8$	$9,6 \pm 4,8$	$10,1 \pm 9,4$	$36,2 \pm 32,5$
>25	n=13	$7,5 \pm 4,1$	$4,5 \pm 2,3$	$6,5 \pm 2,3$	$7,4 \pm 5,7$	$65,0 \pm 35,3$
			p=0,3371 ¹	p=0,2880 ¹	p=0,1411 ¹	p=0,1556 ¹
Total	n=56	$6,6 \pm 3,5$	$5,7 \pm 2,7$	$9,3 \pm 4,5$	$8,6 \pm 6,7$	$45,8 \pm 33,2$

¹p calculado por prueba t de Student no pareada en los distintos sexos y grupos de edad

EFFECTOS TERAPEUTICOS EN LEISHMANIASIS CUTANEA

No encontramos diferencias significativas entre masculinos y femeninos ($p=0,22$) en cuanto al número de personas donde las lesiones no remitieron pero sí en cuanto al mayor número de ausencia de remisión en los mayores de 25 años ($p=0,006$), (Cuadro 1). Tampoco encontramos diferencias significativas en cuanto al número de inoculaciones de promastigotes+BCG entre masculinos y femeninos o entre los grupos de edad en las personas con o sin remisión de las lesiones leishmánicas después del tratamiento (Cuadro 2).

El tiempo de remisión clínica de las lesiones en todo el grupo fue de $8,6 \pm 6,7$ meses no encontrándose diferencias significativas entre masculinos y femeninos ($p=0,21$) o entre los grupos de edad ($p=0,15$) (Cuadro 2).

Los pacientes no curados que ameritaron tratamiento con Glucantime® después de la administración de promastigotes+BCG, necesitaron $45,8 \pm 33,2$ dosis del antimonial pentavalente para conseguir la remisión clínica de las lesiones siendo mayor el número de dosis en los pacientes masculinos (55 ± 49) y en los $>$ de 25 años de edad (65 ± 35) aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2).

En el 39,5% de los pacientes (17/43) tratados con promastigotes+BCG se encontraron recidivas de la enfermedad a los $48,4 \pm 30,5$ meses de haber cicatrizado la lesión primaria (4 años después). No encontramos diferencias significativas en el número de recidivas ni en el tiempo de su aparición entre masculinos y femeninos o entre los grupos de edad (Cuadro 3).

De los 17 pacientes con recidivas 4 curaron sin tratamiento mientras que de los 13 restantes, 8 necesitaron tratamiento con Glucantime® (33 ± 11 dosis) y 5 fueron tratados con proteínas de amastigotes (4 dosis) remitiendo totalmente las lesiones leishmánicas. En el grupo que curó sin tratamiento se han presentado de nuevo segundas recidivas en tres pacientes que han ameritado tratamiento con Glucantime.

En la Figura 3 observamos la reactivación de una cicatriz leishmánica después de 18 inoculaciones de promastigotes+BCG. El paciente necesitó tratamiento con 80 ampollas de Glucantime para su completa remisión. También observamos en un paciente, la reactivación de la lesión (Figura 4a) 6 meses después de haber recibido 8 inoculaciones de promastigotes+BCG, comenzando el proceso por el borde de la cicatriz (Figura 4b) y remitiendo clínicamente después de 40 dosis de Glucantime®.

Un niño de 3 años tratado en diciembre de 1992 con 4 inoculaciones de promastigotes+BCG (Figura 5a), hizo una reactivación de la lesión primaria (flechas) 4 meses después del tratamiento (Figura 5b) y además presentó recidiva de la enfermedad en la forma de una úlcera secundaria (asterisco) en mayo de 1993 (Figura 5c).

También hemos observado recidivas (asterisco) 6 meses después de la remisión de la lesión primaria (flecha) con 6 inoculaciones de promastigotes+BCG (Figura 6); 6 años después de 8 inoculaciones de promastigotes+BCG (Figura 7); 1 año después (asterisco) de 8 inoculaciones de promastigotes +BCG

Cuadro 3

Recidivas de la enfermedad en pacientes tratados con promastigotes + BCG distribuidos según sexo y grupos de edad

		SIN recidiva	CON recidiva		Aparición recidiva (meses)	
MASCULINOS	n=30	22 (73,3%)	8 (26,7%)		$46,3 \pm 34,8$	
FEMENINOS	n=26	17 (65,4%)	9 (34,6%)	$p=0,57024^1$	$47,2 \pm 27,6$	$p=0,9534^2$
< 25	n=43	31 (72,0%)	12 (28,0%)		$48,5 \pm 31,8$	
>25	n=13	8 (61,5%)	5 (38,5%)	$p=0,50439^1$	$48,0 \pm 31,7$	$p=0,9768^2$
Total	n=56	39 (69,7%)	17 (30,4%)		$48,4 \pm 30,5$	

¹ El valor de p se calculó por medio de la prueba exacta de Fisher, comparando las 4 variables en pacientes sin recidiva y con recidiva según sexo y grupos de edad.

² El valor de p se calculó con prueba t de Student no pareada comparando los tiempos en los sexos y grupos de edad.



Figura 3. Reactivación de una cicatriz leishmánica (flecha) tratada con 18 inoculaciones de promastigotes+BCG que comenzó al final del tratamiento y que luego requirió la administración de 80 dosis de Glucantime hasta la remisión de la lesión.



(Figura 8); y 4 meses después (asterisco) de 16 inoculaciones de promastigotes+BCG (Figura 9A, 11B, 11C).

El grupo de 40 pacientes tratados con Glucantime, conformado por igual número de hombres (53%) y mujeres (46%), mostró un 100% de remisión clínica de las lesiones con un promedio de 29 ± 20 dosis del antimonial pentavalente en un tiempo de $2,5 \pm 1,4$ meses. Tanto el número de dosis como el tiempo de curación fue similar en hombres y mujeres y en menores o mayores de 25 años. Nótese que la dosis en el caso de los pacientes tratados con promastigotes +BCG es casi el doble de la necesaria para la remisión clínica de las lesiones en pacientes tratados con Glucantime® (29 ± 20) que no han recibido la mezcla de promastigotes+BCG con anterioridad (Cuadro 4).

El 12,5% de los pacientes tratados con Glucantime, presentó recidiva de la enfermedad a los $32,6 \pm 38,2$ meses de la remisión clínica de las lesiones (3 años). De estos pacientes 2 curaron sin tratamiento y 3 necesitaron $23 \pm 5,7$ dosis de Glucantime para su nueva curación (Cuadro 4).

Los 29 pacientes leishmánicos tratados con las proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias presentaron remisión total de las lesiones en el 100% de los casos, con un promedio de $8,1 \pm 6,5$ dosis en $2,3 \pm 1,9$ meses. El número de dosis ($p=0,02$) y el tiempo ($p=0,01$) de remisión de las lesiones fue menor en mujeres que en hombres. En 24 meses de observación no hemos encontrado recidivas de la enfermedad (Cuadro 5).



Figura 4. Paciente de 40 años de edad quien tuvo leishmaniasis en 1991, recibiendo 8 inoculaciones de promastigotes + BCG, después de lo cual tuvo remisión de la lesión en 6 meses. Posteriormente la lesión se reactivó (flecha 4a) en noviembre de 1992, proceso que comienza por el borde de la úlcera (flecha, 4b) y que ameritó tratamiento con 40 dosis de Glucantime®.

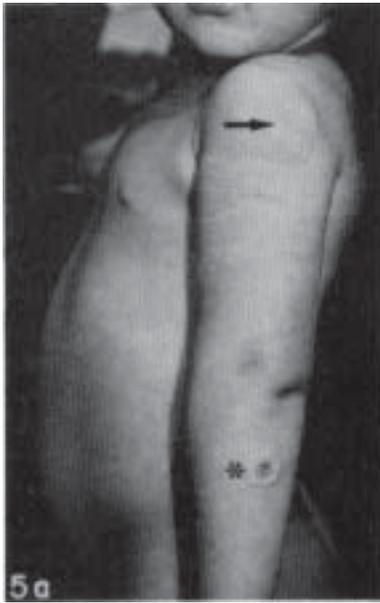


Figura 5. Niño de 3 años que tuvo leishmaniasis en el hombro izquierdo en diciembre de 1992 (flecha, Figura 5a) habiendo sido tratado con 4 inoculaciones de promastigotes+BCG. La lesión primaria se reactivó 4 meses después del tratamiento (flecha, Figura 5b) y además presentó recidiva de la enfermedad en mayo de 1993 (asterisco, 5a y 5c).



Figura 6. Paciente de 17 años con úlcera leishmánica (flecha) en 1989, cuando recibió 6 inoculaciones de promastigotes+BCG después de lo cual la lesión remitió clínicamente en un lapso de 6 meses. Posteriormente en agosto de 1993 presenta una recidiva de la enfermedad (asterisco) en la muñeca del mismo brazo que remitió con 30 dosis de Glucantime®.

Figura 7. Paciente femenino de 8 años de edad que tuvo úlcera leishmánica en 1989 la cual remitió (flecha) con 10 inoculaciones de promastigotes+BCG en un lapso de 24 meses. Posteriormente en abril de 1995 aparece úlcera recidiva (asterisco) en la misma pierna derecha.



Figura 8. Paciente femenina de 22 años que presentó úlcera leishmánica en la pierna izquierda en septiembre de 1992, recibiendo 8 inoculaciones de promastigotes+BCG, remitiendo la lesión en un lapso de 10 meses dejando una cicatriz prominente (flecha). Posteriormente, en septiembre de 1993 aparece recidiva en la base del 4° dedo del pie izquierdo (asterisco), la cual remitió espontáneamente.



Como puede observarse, una lesión extensa en el pabellón auricular derecho (Figura 10a) remitió totalmente después de 25 dosis de proteínas de amastigotes a los 8 meses de tratamiento (Figura 10b); una úlcera leishmánica en pierna derecha (Figura 11a) después de 13 dosis en un lapso de 3 meses (Figura 11b); una úlcera leishmánica en pierna derecha (Figura 12a) después de 22 dosis en un lapso de 5 meses (Figura 12b); una úlcera leishmánica en dorso del muslo izquierdo (Figura 13a) después de 8 dosis en un lapso de 2 meses (Figura 13b); una úlcera leishmánica en dorso de pierna derecha (Figura 14a) después de 9 dosis en un lapso de 2,2 meses (14b); dos úlceras en tobillos (Figura 15a) después de 4 dosis en 1 mes (Figura 15b); una úlcera en dedo pulgar de mano derecha (Figura 16a) después de 14 dosis en 3,5 meses (Figura 16b) y una úlcera en antebrazo izquierdo (17a) después de 5 dosis en 1,2 meses (Figura 17b).

La infección por el parásito leishmánico conduce a veces a la curación espontánea de la enfermedad. Esta cifra alcanza a 14,2% en personas no vacunadas IDR negativas en la zona del Ingenio (29)



Figura 9. Paciente masculino de 58 años de edad que presentó úlcera leishmánica (9a) en marzo de 1992 recibiendo 16 inoculaciones (9b) de promastigotes+BCG remitiendo clínicamente (flecha) al año y medio después del tratamiento (9a). Posteriormente presenta recidiva de la enfermedad (asterisco, 9a y 9c) a los 4 meses de finalizado el tratamiento ameritando la aplicación de 40 ampollas de Glucantime® hasta su remisión clínica,

EFFECTOS TERAPEUTICOS EN LEISHMANIASIS CUTANEA



Figura 10. Paciente masculino de 40 años con lesión leishmánica en pabellón auricular derecho antes (10a) y después (10b) de 25 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias, en un lapso de 8 meses hasta la remisión clínica de la lesión.

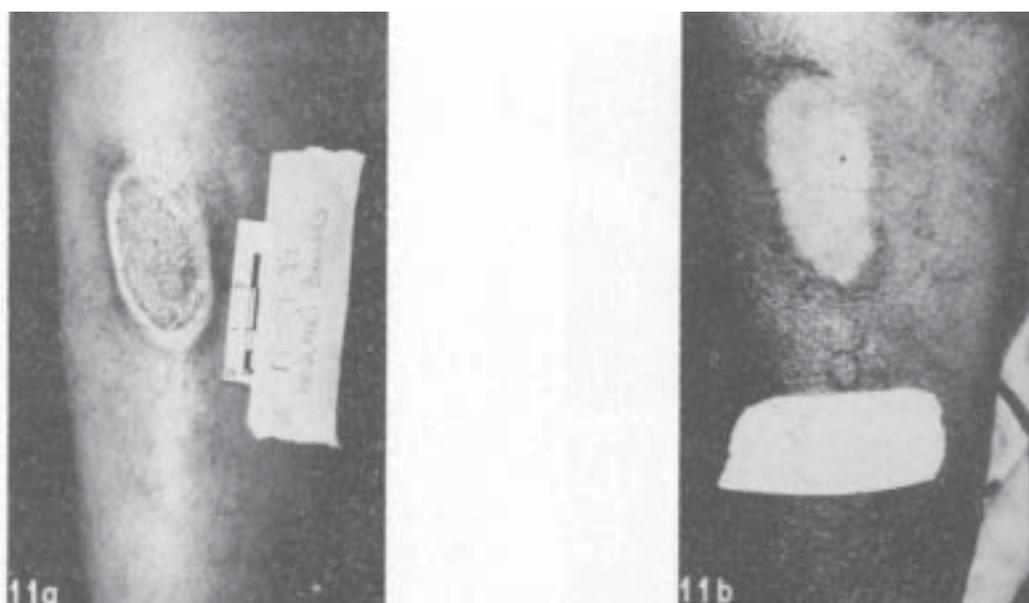


Figura 11. Paciente femenino de 25 años de edad con úlcera leishmánica en pierna derecha en marzo de 1994 antes (11a) y después (11b) de 13 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias en un lapso de 3 meses.

Cuadro 4
Evolución de los pacientes tratados con Glucantime

		Remisión clínica	Promedio de dosis aplicadas	Promedio de remisión (meses)	Sin recidiva	Con recidiva	Tiempo aparición de recidiva (meses)
FEMENINOS	n=21	21 (100%)	26 ± 15	2,59 ± 1,54	18 (85,8%)	3 (14,2%)	21,66 ± 16,25
MASCULINOS	n=19	19 (100%)	32 ± 25	2,50 ± 1,34	17 (89,5%)	2 (10,5%)	49,66 ± 66,4
				p=0,3578 ¹	p=0,4273 ¹	p=1,0 ²	p=0,0689 ¹
< 25	n=20	20 (100%)	28 ± 19	2,97 ± 1,46	18 (90,0%)	2 (10,0%)	49,66 ± 66,46
>25	n=20	20 (100%)	30 ± 22	2,03 ± 1,23	17 (85,0%)	3 (15,0%)	21,66 ± 16,25
				p=0,7600 ¹	p=0,3391 ¹	p=1,0 ²	p=0,0751 ¹
Total	n=40	40 (100%)	29 ± 20	2,55 ± 1,42	35	5 (12,5%)	32,6 ± 38,22

¹ El valor de p se calculó con prueba t de Student no pareada en los distintos sexos y grupos de edad.

² El valor de p se calculó por medio de la prueba exacta de Fisher, comparando las 4 variables en pacientes sin recidiva y con recidiva según sexo y grupos de edad.

Cuadro 5
Evolución de los pacientes tratados con proteínas de amastigotes

		Remisión clínica	Promedio de dosis aplicadas	Tiempo de remisión (meses)	Aparición de recidiva ² (meses)
FEMENINOS	n=13	13 (100%)	5,5 ± 4,1	1,47 ± 0,57	0
MASCULINOS	n=16	16 (100%)	11,0 ± 7,7	3,25 ± 2,46	0
				p=0,0283 ¹	p=0,0169 ¹
<25	n=14	14 (100%)	8,1 ± 8,0	1,92 ± 1,64	0
>25	n=15	15 (100%)	8,7 ± 6,1	2,58 ± 2,12	0
				p=0,8426 ¹	p=0,3592 ¹
Total	n=29	29 (100%)	8,1 ± 6,5	2,31 ± 1,91	0

¹p calculado por prueba t de Student en los distintos sexos y grupos de edad.

²Dos años de seguimiento después de remisión clínica.

Cuadro 6
Evolución de los pacientes con remisión clínica espontánea

	Remisión clínica	Tiempo de remisión (meses)
FEMENINOS	19 (100%)	3,65 ± 3,22
MASCULINOS	27 (100%)	2,87 ± 1,85
		p=0,4273 ¹
< 25	27 (100%)	3,22 ± 2,01
>25	19 (100%)	3,82 ± 3,25
		p=0,3391 ¹
Total	46 (100%)	3,23 ± 2,56

¹ calculado por prueba t de Student en los distintos sexos y grupos de edad.

Los 46 pacientes que presentaron remisión espontánea de las lesiones en su mayoría pertenecieron al sexo masculino (58,69%) y a los menores de 25 años de edad (58,69%), con un tiempo de remisión de 3,2 ± 2,5 meses sin diferencias significativas en los distintos grupos estudiados (Cuadro 6). En la Figura 18a puede observarse la úlcera leishmánica en un paciente que había tenido leishmaniasis hace 7 años, la cual remitió espontáneamente en 1 mes (Figura 18b). En la figura 19a observamos una úlcera en un paciente con IDR negativa previa que en 5 meses remitió completamente sin tratamiento (Figura 19b).

EFFECTOS TERAPEUTICOS EN LEISHMANIASIS CUTANEA

Cuadro 7

Comparación de los tiempos de remisión clínica de las lesiones en pacientes sometidos a diversos tratamientos

	Remisión espontánea vs.	Promastigotes + BCG	Proteínas de amastigotes	Glucantime
Tiempo promedio (meses)	3,23	8,6	2,31	2,55
Número de personas	46	56	29	40
Desviación estándar	2,56	6,73	1,91	1,42
Error estándar	0,48	0,95	0,46	0,25
Mínimo	1	1	1	1
Máximo	11	36	8	6
Prueba t no pareada				
Diferencia promedio		5,278	-0,92	-0,3199
Intervalo de confianza de 95% p para dos colas		[3,28 a 7,45] <0,0001	[-2,02 a 0,18] 0,1005	[-0,58 a 1,22] 0,4847

Cuadro 8

Diámetro de las cicatrices en pacientes tratados con promastigotes+BCG Glucantime, proteínas de amastigotes y los que curaron espontáneamente

	Remisión espontánea	Promastigotes y BCG	Proteínas de amastigotes	Glucantime
FEMENINOS	n=19 2,18 ± 2,04	n=30 2,44 ± 1,56	n=13 1,65 ± 1,12	n=24 3,93 ± 2,08
MASCULINOS	n=27 2,55 ± 2,97	n=26 2,58 ± 1,41	n=16 2,08 ± 0,8	n=16 2,69 ± 0,75
< 25	n=27 2,22 ± 3,0	n=48 2,59 ± 1,54	n=14 1,61 ± 0,98	n=16 3,14 ± 1,31
>25	n=19 2,65 ± 1,96	n=8 2,03 ± 1,05	n=15 2,17 ± 0,88	n=24 3,64 ± 2,05
Total	n=46 2,4 ± 2,58	n=56 2,48 ± 1,46	n=29 1,9 ± 0,96	n=40 3,44 ± 1,77

Cuadro 9

Comparación de los tamaños de las úlceras leishmánicas de los pacientes con remisión espontánea con los pacientes al final del tratamiento con promastigotes+ BCG, proteínas de amastigotes o Glucantime

	Remisión espontánea vs.	Promastigotes y BCG	Proteínas de amastigotes	Glucantime
Diámetro promedio (cm)	2,4	2,48	1,9	3,44
Número de personas	46	56	29	40
Desviación estándar	2,58	1,46	0,96	1,46
Error estándar	0,55	0,17	0,16	0,41
Mínimo	0,4	0,3	0,4	1
Máximo	12	8	4	8
Prueba t no pareada				
Diferencia promedio		0,079	0,321	1,040
Intervalo de confianza de 95% p para dos colas		-0,73 a 0,885 0,844	-1,49 a 0,49 0,321	1,22 a 1,95 0,027

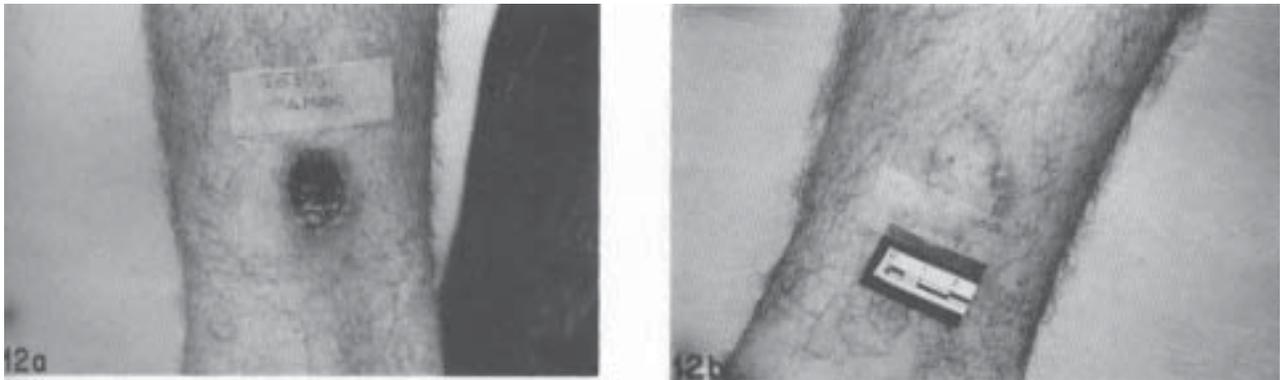


Figura 12. Paciente masculino de 14 años de edad con úlcera leishmánica en pierna derecha en noviembre de 1994 antes (12a) y después (12b) de 22 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias en un lapso de 5 meses hasta la remisión clínica de las lesiones.

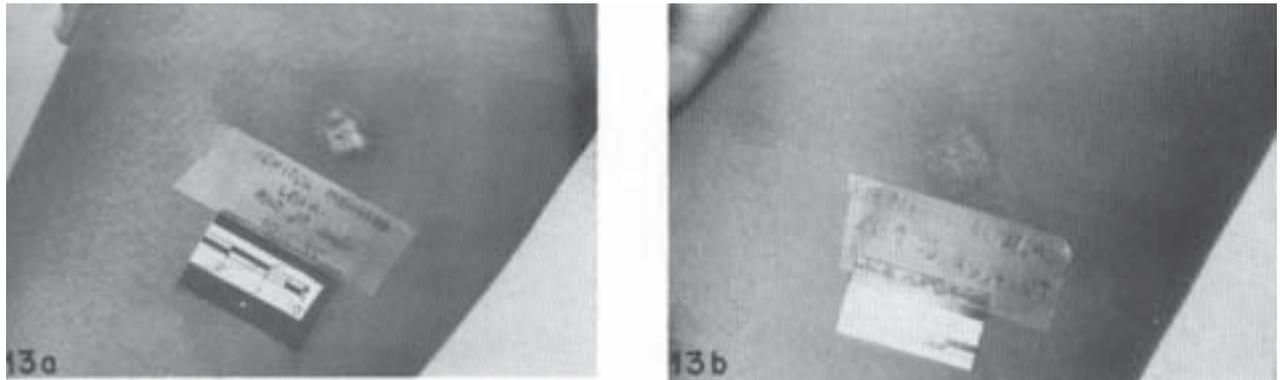


Figura 13. Paciente femenino de 15 años de edad con úlcera leishmánica en dorso del muslo izquierdo antes (13a) y después (13b) de 8 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias en un lapso de 2 meses.

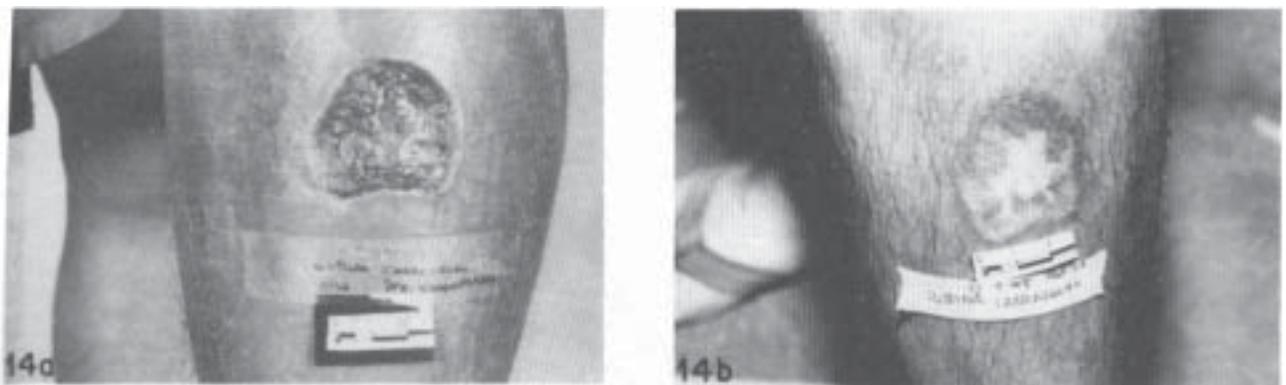


Figura 14. Paciente femenino de 35 años de edad con úlcera leishmánica en dorso de pierna derecha en febrero de 1995 antes (14a) y después (14b) de 9 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias en un lapso de 9 semanas.

EFFECTOS TERAPEUTICOS EN LEISHMANIASIS CUTANEA

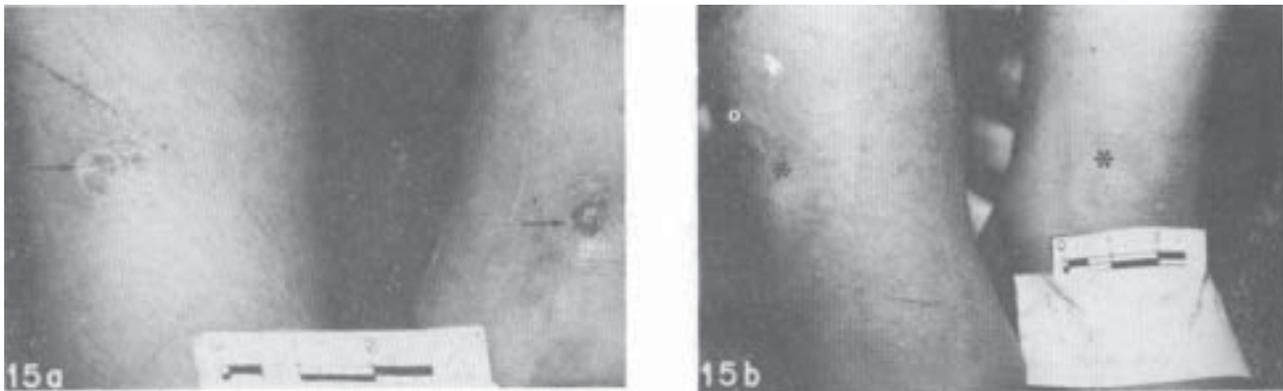


Figura 15. Paciente masculino de 9 años de edad, con 2 úlceras leishmánicas en ambos tobillos antes (flecha, 15a) y después (asteriscos, 15b) de 4 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias, en un lapso de 1 mes.

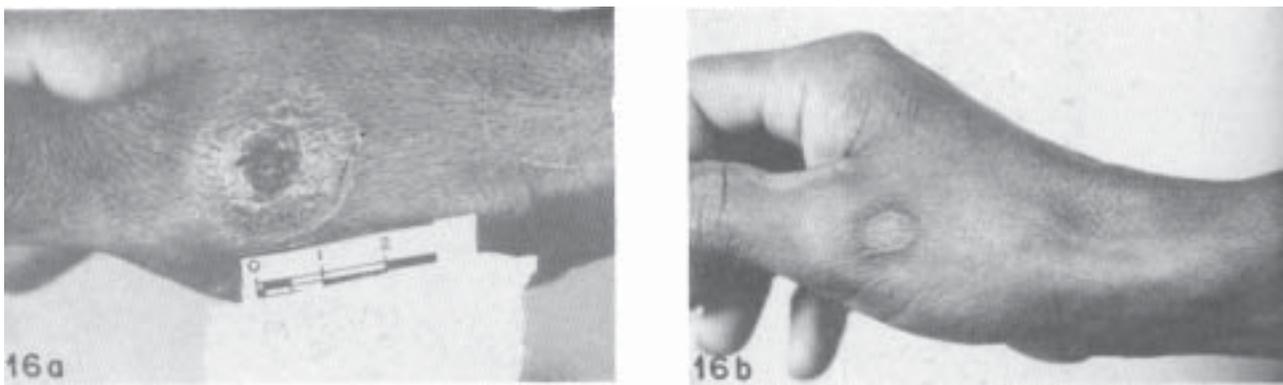


Figura 16. Paciente masculino de 30 años con úlcera leishmánica en base del dedo pulgar de la mano derecha en julio de 1994 antes (16a) y después (16b) de 14 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias en un lapso de 3,5 meses.

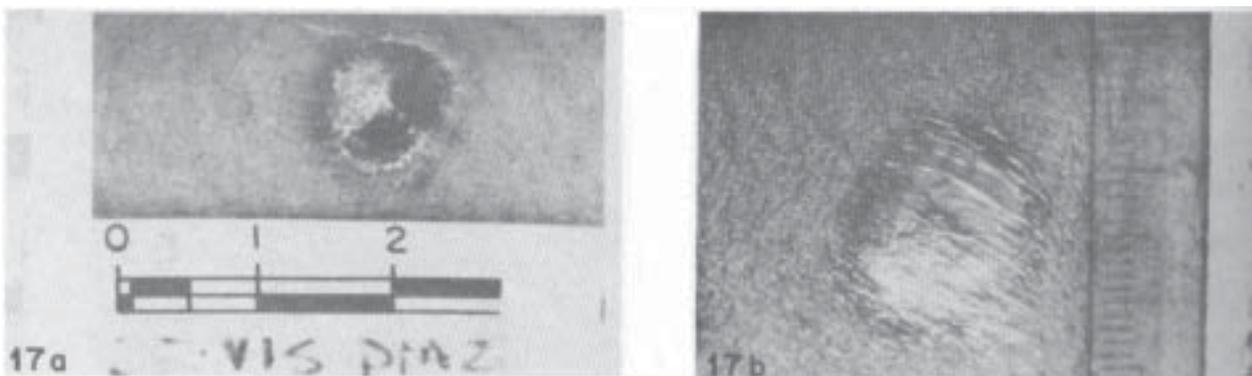


Figura 17. Paciente masculino de 10 años de edad con úlcera leishmánica en antebrazo izquierdo en junio de 1994 antes (17a) y después (17b) de 5 dosis de proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias en un lapso de 5 semanas.

Cuadro 10

Diámetro de la intradermoreacción con antígenos de amastigotes después de los diversos tratamientos

	Remisión espontánea vs.	Promastigotes y BCG	Proteínas de amastigotes	Glucantime
Diámetro promedio (mm)	11,9	15,0	11,8	11,7
Número de personas	46	56	29	40
Desviación estándar	3,5	3,8	4,9	5,4
Error estándar	1,17	1,3	1,7	1,9
Mínimo	6,3	7,2	6,5	4,7
Máximo	17,4	20,6	20,9	21,9
Prueba t no pareada				
Diferencia promedio		3,100	-0,090	-0,190
Intervalo de confianza del 95% p para dos colas		[1,65 a 4,54] <0,0001	[-2,03 a 1,83] 0,918	[-2,03 a 1,72] 0,837

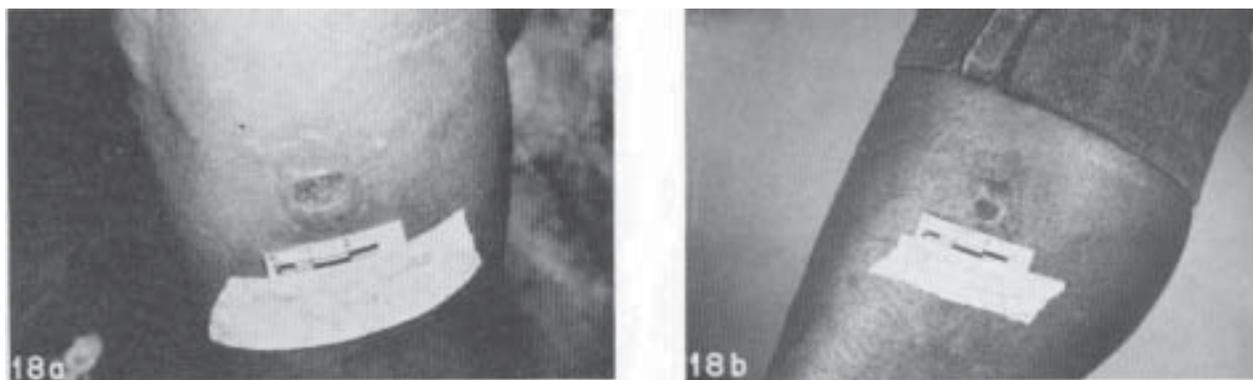


Figura 18. Paciente femenino de 53 años de edad con 21,04 mm de IDR en 1993 que presentó úlcera leishmánica en hombro izquierdo en 1987 con remisión clínica espontánea de la lesión en un lapso de 2-3 meses. Posteriormente presentó lesión ulcerativa con abundantes parásitos en pierna izquierda en agosto de 1994 (18a) que remitió espontáneamente en 1 mes (18b).

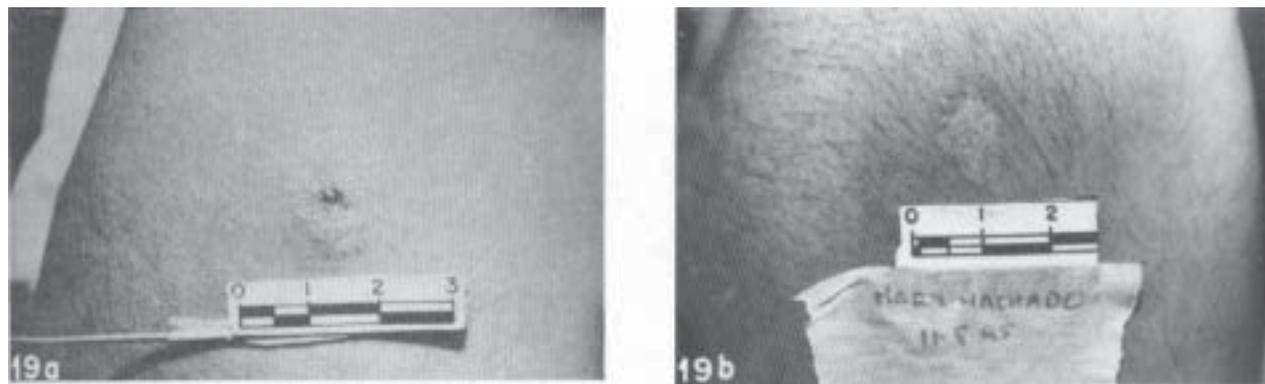


Figura 19. Paciente femenino de 20 años de edad con IDR negativa que presentó úlcera leishmánica en antebrazo izquierdo en octubre de 1993 (19a), lesión que remitió en forma espontánea en 5 meses de evolución (19b).

EFECTOS TERAPEUTICOS EN LEISHMANIASIS CUTANEA

Cuadro 11

Diámetro de las inoculaciones subcutáneas en pacientes tratados con promastigotes + BCG

Número de inoculaciones	141
Diámetro promedio (mm)	5,9
Desviación estándar (mm)	2,64
Mínimo (mm)	1
Máximo (mm)	14
Error estándar (mm)	0,2

Al comparar los tiempos de remisión clínica espontánea (3,2 meses) con los tiempos de remisión de los pacientes que recibieron la mezcla de promastigotes +BCG (8,6 meses), encontramos una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0,0001$), no así al compararlos con los tiempos de remisión en los pacientes que recibieron proteínas de amastigotes (2,3 meses, $p = 0,20$) o Glucantime (2,5 meses, $p = 0,19$) (Cuadro 7).



Figura 20. Paciente masculino de 17 años que presentó úlcera leishmánica en la espalda en 1992, recibiendo 6 inoculaciones de promastigotes+BCG remitiendo clínicamente la lesión en un lapso de 8 meses quedando con una cicatriz hipertrófica de apariencia queloidea.



Figura 21. Paciente de la Figura 6 con cicatriz queloidea residual.

Cuadro 12

Comparación del número de casos de recidivas con los distintos tratamientos

	Remisión espontánea vs.	Promastigotes y BCG	Proteínas de amastigotes	Glucantime
Número de recidivas	4	17	0	5
Número de personas	46	56	29	40
Prueba exacta de Fisher p para las dos colas		0,012	-	0,72
Riesgo relativo		0,219	-	0,667



Figura 22. Paciente masculino de 21 años con leishmaniasis en septiembre de 1989, cuando recibió 6 inoculaciones de promastigotes+BCG, con remisión clínica en un lapso de 8 meses dejando como secuela una cicatriz hipertrófica en el área de la lesión.



Figura 24. Paciente de la Figura 3 mostrando los nódulos cicatriciales dejados por las 18 inoculaciones de promastigotes+BCG, similares en ambos brazos. En la foto se muestran las inoculaciones del brazo izquierdo solamente.

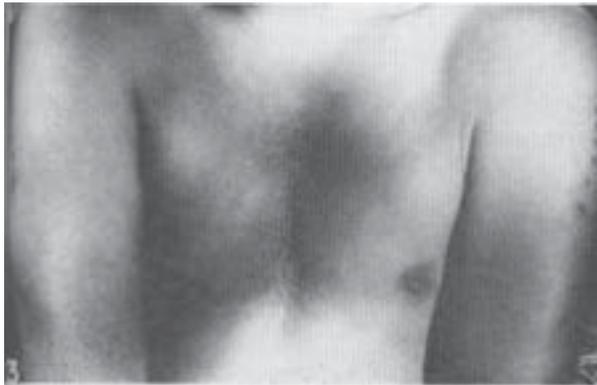


Figura 23. Paciente de la Figura 2 mostrando las 12 inoculaciones de promastigotes+BCG en ambas regiones deltoideas.



Figura 25. Paciente de la Figura 8 con los nódulos cicatriciales dejados por las inoculaciones de promastigotes+BCG

Los diámetros de las cicatrices después del tratamiento fueron menores en los pacientes que recibieron proteínas de amastigotes y en los de remisión espontánea de la enfermedad. En cambio, los tratados con promastigotes+BCG o Glucantime® presentaron diámetros mayores, no observando diferencias en cuanto a sexo o grupos de edad (Cuadro 8). Tampoco encontramos diferencias significativas entre los tamaños de las cicatrices de los distintos grupos nombrados (Cuadro 9).

Varios pacientes que recibieron el tratamiento de promastigotes+BCG presentaron cicatrices que-
loides en el sitio de la lesión (Figuras 20, 21 y 22).

La intradermoreacción con antígenos de amastigotes de las cuatro especies de leishmanias empleadas en la vacuna, dio valores más altos en los pacientes tratados con promastigotes+BCG que en los que recibieron proteínas de amastigotes, Glucantime® o los que remitieron espontáneamente. Al comparar los diámetros de los que remitieron espontáneamente con los que recibieron proteínas de amastigotes o Glucantime no hubo diferencias significativas, sólo al comparar estos valores con las personas que recibieron promastigotes+BCG encontramos diferencias significativas ($p=0,0001$) (Cuadro 10).

El diámetro promedio de las inoculaciones de promastigotes+BCG que dejaron cicatrices en el 89% de los pacientes fue de 5,9 mm con un rango de 1-14 mm como se observa en el Cuadro 11 y en las Figuras 23, 24, y 25).

Al comparar el número de recidivas en pacientes con curación espontánea vs. aquellos pacientes sometidos a distintos tratamientos encontramos un mayor número de casos en los pacientes que recibieron la mezcla de promastigotes + BCG ($p=0,012$). Al realizar la misma comparación con los pacientes tratados con Glucantime, el número de recidivas es similar a los que remitieron espontáneamente. Hasta ahora no hemos encontrado recidivas de la enfermedad en los pacientes tratados con proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias (Cuadro 12).

DISCUSION

En este trabajo hemos presentado evidencias de que el efecto terapéutico de la mezcla de promastigotes+BCG no induce la remisión clínica de las

lesiones leishmánicas en una cuarta parte de los pacientes tratados residentes de "La Planta", un área hiperendémica de leishmaniasis situada en Guatire, Edo. Miranda, Venezuela.

La persistencia de las lesiones ulcerosas en la piel de los pacientes infectados se observó a pesar de haber recibido el doble de inyecciones de la mezcla de promastigotes + BCG en comparación con los pacientes que presentaron remisión clínica de la enfermedad.

Estos resultados contrastan con lo publicado por Convit y col. (23) quienes reportan un 94% de curación a las 32 semanas en 52 pacientes inyectados con 3 dosis de la mezcla de promastigotes+BCG (2 inyecciones de 0,25 ml cada una, en cada brazo, por dosis, es decir 6 inoculaciones).

Para explicar la alta tasa (23,2%) de ausencia de remisión clínica de las lesiones observada después del tratamiento con promastigotes+BCG en "La Planta", debemos analizar varios factores. Empezaremos por el papel que desempeña la ruta de inoculación subcutánea empleada por Convit y col. (23).

En 1974, Lemma y Cole demostraron que los promastigotes irradiados de *Leishmania enrietti* al inyectarlos como antígeno por vía s.c. eran totalmente ineficientes para proteger a cobayos contra la infección leishmánica (33).

En otra serie de experimentos, Liew y col. en 1985 prueban sin lugar a dudas que los promastigotes irradiados con 150 krad o muertos por calor inyectados por vía i.v. protegen a los ratones susceptibles BALB/c contra una infección mortal por *Leishmania major*, sin embargo al suministrar 2×10^7 promastigotes a través de 4 inyecciones s.c. y luego una i.v. los animales no se protegen contra la infección con 2×10^5 parásitos. Los ratones con la inyección intravenosa sola sí están protegidos contra la enfermedad, los que recibieron la inyección s.c. no (34).

Los parásitos irradiados administrados mediante inyecciones subcutáneas son capaces de bloquear el efecto protector del mismo antígeno inyectado por vía i.v. El efecto inhibitor puede observarse con una sola inyección, aunque con una menor potencia que al usar 4 inyecciones s.c. y éstas son efectivas hasta contra 4 inmunizaciones i.v. semanales. El bloqueo de la respuesta protectora producido por la inyección s.c. persiste por 100 días y se puede observar un efecto bloqueador débil por una inyección s.c. después de la inyección i.v. (34).

El bloqueo de la protección inducida por la inyección i.v. no depende de la viabilidad de los promastigotes ya que se obtiene inyectando por vía s.c. parásitos muertos por calor, por formol o por sonicación. El efecto se observa tanto en ratones susceptibles como en ratones resistentes a la enfermedad y es independiente del complejo mayor de histocompatibilidad H-2. La base de este efecto puede deberse a la sensibilización de diferentes células presentadoras de antígeno localizadas en la vía i.v. o la vía s.c., las cuales estimularán en un caso (vía i.v.) células T ayudadoras o en el otro (vía s.c.) células T supresoras de la respuesta inmunitaria respectivamente (34).

Estos mismos autores publican en un trabajo posterior que la inducción del efecto bloqueador de la inyección s.c. es leishmania-específico, pues la inhibición de la protección puede obtenerse con promastigotes de *Leishmania donovani* pero no con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Liew y col. también reportan que las inyecciones s.c. múltiples no inhiben la respuesta de anticuerpos inducida por la inyección i.v. y más bien inducen sensibilización linfocitaria primaria ("priming") para la producción de anticuerpos, por lo que la respuesta humoral no parece ser importante en este caso. Las inyecciones s.c. de parásitos irradiados indujeron una respuesta de sensibilidad tardía (RST) que pudo transferirse tanto local como sistémicamente, aunque más débil que en los animales curados de la enfermedad experimental, así como también desencadenaron respuestas linfocitarias específicas medidas mediante ensayos de transformación linfocitaria, menores que en los animales curados (35).

A pesar de esta RST/ayudadora, al transferir 5×10^7 células T esplénicas de animales inmunizados con 4 inyecciones s.c. de promastigotes irradiados a receptores normales la respuesta protectora de la inyección i.v. es totalmente bloqueada, efecto que no se observa al quitar las células T (supresoras) del bazo del animal inmunizado. La célula inhibidora es de fenotipo Lyt+2-, L3T4+ y contrarrestan completamente el efecto protector de las células T de un animal inyectado por vía i.v. cuando ambas son mezcladas en un animal irradiado con 550 rad. Estas células T producidas por la inyección s.c. son tan potentes como las células T supresoras de un animal con enfermedad progresiva crónica (35).

Las células responsables de la RST se inducen normalmente inmunizando con cualquier antígeno por vía s.c., mientras que los antígenos presentados

a altas dosis por vía parenteral engendran células T que suprimen la RST cutánea (36).

Los ratones con 4 inyecciones s.c. de promastigotes irradiados desarrollan RST específica, iguales a los ratones convalescientes de una infección por **L major**, sin embargo los ratones inyectados por vía s.c. presentan una infección leishmánica mayor. Esto quizás sea debido a que las linfoquinas que inducen la RST son distintas a las linfoquinas responsables de una respuesta de inmunidad celular protectora contra la enfermedad (CMI).

Estas ideas son corroboradas por McGurn y col. en 1990 usando una forma avirulenta de **L major**, producida por mutágenos químicos capaces de inmunizar ratones BALB/c y C57BL/6 contra una cepa de **L major** virulenta. La inmunización sólo se consiguió al inyectar el parásito avirulento por vía i.v. o i.p. pues al usar la vía s.c. se observó más bien una exacerbación de la infección por **L major**. La protección obtenida por las vías i.v. o i.p. pudo transferirse con células T CD4+, pero no con CD8+ (37).

Por lo tanto, no se deben inyectar los parásitos por vía subcutánea pues esto ha conducido en varios trabajos realizados con animales experimentales no sólo a un incremento significativo de la enfermedad, sino a un bloqueo del efecto protector de la inmunización por vía intravenosa. Por lo tanto, el uso de tal procedimiento está contraindicado en seres humanos.

Un segundo punto que explicaría la ineficacia del tratamiento de promastigotes+BCG es el uso de parásitos muertos por calor, pues se ha demostrado que tal tratamiento los transforma en antígenos incapaces de inducir protección en el vertebrado infectado posteriormente con parásitos leishmánicos.

Rivier y col. en 1993 comparan la cepa IR76 de **L major** de alta virulencia, denominada así pues produce lesiones que no curan en las cepas de ratones CBA, con la cepa de **L major** LV39 de menor virulencia, que reproduce en los mismos ratones las úlceras de piel observadas en el hombre infectado con leishmanias. Estas úlceras en el ratón curan espontáneamente en 2-4 meses después de la infección, igual a lo que se observa en algunos casos de leishmaniasis humana. La cepa IR76 ha sido también empleada en ensayos de leishmanización en seres humanos (38).

Los promastigotes de IR76 irradiados con 150 krad inyectados por vía s.c. o i.v. en contradicción con trabajos anteriores, confieren un alto grado de

protección a ratones CBA al infectarlos con cepas de **L major** homólogas (IR76) o heterólogas (LV39)(37). La diferencia con los trabajos de Liew (34) quizás radique en que estos autores usaron una cepa de ratones distinta, lo cual trae a colación la variabilidad de la respuesta entre una cepa de ratón a otra y por ende en la población heterocigota animal o humana, lo cual discutiremos más adelante.

Los parásitos muertos resultaron menos eficientes que los parásitos vivos irradiados para inducir protección contra la infección. Una dosis de 150 krad como mínimo era necesaria para quitarle la virulencia a los parásitos según pruebas realizadas en BALB/c ya que cualquier dosis de radiación menor produce en los animales úlceras leishmánicas. Sin embargo a pesar de esta radiación gamma no todas las leishmanias estaban inactivadas pues se detectaron parásitos vivos en la almohadilla plantar y ganglios inguinales 28 días (CBA) o 18 semanas (BALB/c) después de la inoculación parasitaria (38).

Los promastigotes irradiados con 150 krad se transformaron en amastigotes in vitro. Sin embargo, después de 4 días en cultivo la mayoría murieron, contrario a lo observado con parásitos no irradiados. Las células de los nódulos linfáticos de los animales inmunizados con parásitos irradiados fueron capaces de activar macrófagos infectados para destruir a los parásitos intracelulares (38).

El grado máximo de inmunoprotección se obtuvo con los promastigotes irradiados viables quizás porque estos se transforman en amastigotes en el huésped vertebrado. Rivier y col. también observaron que la adición de adjuvantes no mejoró el pequeño efecto protector observado con la vacuna preparada con leishmanias muertas.

Al mezclar BCG a la vacuna con parásitos muertos la preparación resultó menos activa en la protección contra la enfermedad. Al inyectar BCG solo en la cola del animal se indujo un cierto grado de resistencia al desarrollo de la úlcera causada por LV39, resistencia que disminuyó al añadir las leishmanias muertas. En este experimento, la reducción en el tamaño de la lesión en los ratones fue de 45% con el BCG solo y de 18% cuando los parásitos muertos se combinaron con el BCG (38).

Es decir, los parásitos muertos no sólo son ineficientes para inmunizar a los animales sino que anulan el pequeño efecto protector observado en los animales tratados con BCG solo, por lo tanto, la mezcla de promastigotes muertos por calor+BCG no se debe usar en seres humanos.

Es un hecho común aceptar como dogma que la vacuna BCG protege contra la infección tuberculosa, que es un antígeno inocuo, normalizado, sin riesgo para el paciente y que puede ser usado con una confianza absoluta, conceptos que sin embargo se han tambaleado en la actualidad.

Las vacunas del bacilo Calmette-Guerin (BCG) son preparaciones liofilizadas de una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada en el laboratorio. El producto terminado se prepara a partir de varias cepas, todas derivadas del cultivo original pero que difieren entre si, tanto en la estructura del ADN, así como en su inmunogenicidad y en sus características bioquímicas (39).

La respuesta inmunitaria al BCG induce un estado de sensibilidad a la tuberculina en una proporción grande de individuos previamente no reactivos al PPD, la cual confiere protección contra formas severas de tuberculosis en niños y adolescentes incluyendo la tuberculosis miliar y la meningitis tuberculosa (40). Sin embargo, existe evidencia de complicaciones locales severas tales como adenitis supurativa y osteomielitis en las personas vacunadas (41,42).

La vacunación se realiza de rutina en niños cuando existe un riesgo evidente de infección. Sin embargo, se ha encontrado que el efecto protector del BCG en niños mayores y en adultos es mucho más variable y no siempre presente.

La confianza en la vacuna BCG disminuyó después de realizar en los años 70 en Madras, India, el mayor estudio prospectivo en todo el mundo, donde no se encontró efecto protector alguno contra la tuberculosis pulmonar en la población vacunada con BCG. En este estudio se vacunaron 200 000 niños con reacción previa a la tuberculina negativa sin encontrar reducción en la susceptibilidad de los mismos a la tuberculosis pulmonar (43-46).

En 12 de 14 estudios llevados a cabo en países industrializados se realizaron ensayos de campo en poblaciones más pequeñas encontrando que el BCG protegía contra la tuberculosis clínica (47). Sólo un estudio de tamaño estadísticamente significativo en Puerto Rico no demostró efecto protector al vacunar con BCG (48).

Los resultados del estudio de Madras se interpretaron como fallas metodológicas debido a variables confusas tales como: 1-Potencia inmunogénica inadecuada de diferentes preparaciones de BCG (49-53), 2-Variabilidad del efecto protector del BCG contra diferentes formas clínicas de tuberculosis, 3-

Variabilidad en la virulencia de diferentes cepas de **Mycobacterium tuberculosis**, (54) 4-Coexistencia de otras micobacterias inmunogénicas en la población estudiada, 5-Factores genéticos o demográficos.

Estudios posteriores basados en el control caso por caso y en el meta-análisis de los datos en los grupos vacunados y controles han permitido concluir que hay un 50% de reducción en el riesgo de contraer tuberculosis en niños que han recibido BCG y que existe una protección contra la diseminación de la enfermedad en los grupos vacunados (55-57).

Al aplicar la vacuna BCG sola o acompañada de otro antígeno, es imprescindible tener en cuenta hoy en día que la vacuna alternada de BCG implica el riesgo de una infección tuberculosa generalizada en sujetos inmunosuprimidos, por lo cual debe hacerse la pesquisa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en todas las personas candidatas a recibir BCG (58).

En síntesis, al usar BCG debemos tomar en cuenta todos los parámetros nombrados ya que la variabilidad en su capacidad inmunogénica y en su acción protectora es muy alta, y los resultados a obtener dependen de numerosos factores incontrolables, presentes tanto en el propio bacilo como en el hospedero vertebrado.

Los estudios en ratones han permitido entender un poco más los mecanismos genéticos de la acción del BCG en el huésped vertebrado.

La resistencia a la infección con dosis bajas de BCG (10^4 /ratón), está bajo el control de un gen autosómico dominante localizado en el cromosoma I llamado el gen BCG, el cual existe en la forma de dos alelos: BcgR (resistente) y BcgS (susceptible). La resistencia de los animales al BCG en la fase inicial de la infección depende de la activación de los macrófagos los cuales destruyen al mycobacterium localizado en el citoplasma. El cese del crecimiento bacteriano en ratones BcgS ocurre entre la 3a y 4a semana post-infección y está asociada al desarrollo de inmunidad celular (CMI) (59).

La resistencia y susceptibilidad a la infección de la cepa BCG Montreal ha sido comparada con varias cepas usadas para vacunar contra la tuberculosis en el mundo, como las cepas Pasteur (cepa 1172 P2), Glaxo (cepa 1070), Japón (cepa 172), Copenhagen (cepa 1331) y la cepa de trabajo de la WHO (cepa WHO 3). La comparación se basó en el análisis del crecimiento de los diferentes BCG en el bazo e

hígado de las cepas de ratón C57BL/6, BALB/c, C3H/HeN y DBA/2 después de la inyección i.v. de 2×10^4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ratón. El índice de infección a las 3 semanas fue de 4,74 y 7,12 en C57BL/6 y BALB/c (susceptibles) y de 0,16 y 0,18 en C3H y DAB (resistentes) respectivamente (59).

Como resultado de estos trabajos, Da Silva y Goncalves en 1992, usan el ratón de la cepa DBA/2 con resistencia natural al BCG para probar el efecto de la mezcla de parásitos+BCG en el curso de la leishmaniasis experimental. El DBA/2 también es resistente a la infección por **L amazonensis** ya que la lesión se desarrolla lentamente, persiste por 12 meses y el ratón permanece vivo hasta 15 meses después de la infección.

Los animales fueron tratados con BCG (2×10^6 /ratón) por vía s.c. en la almohadilla plantar izquierda, 14 días antes de la inmunización con fracción microsomal ($20 \mu\text{g}$ /ratón) de promastigotes en el mismo sitio. Seis días después de la última inmunización se infectaron con 1×10^6 amastigotes en la almohadilla plantar derecha. Las lesiones en el grupo vacunado con BCG+fracción microsomal fueron 2-3 veces mayores que en los controles 12 meses después de la infección, con un gran número de amastigotes en los macrófagos localizados en el sitio del inóculo infectante. Es decir, la mezcla de parásitos+BCG exacerbó la enfermedad (60).

Estos experimentos, al igual que los de Rivier y col. ya citados (38), arrojan serias dudas acerca del uso de la mezcla de promastigotes+BCG para controlar la leishmaniasis y creemos que es una evidencia sólida más que contraindica totalmente el uso de este tratamiento contra la leishmaniasis en seres humanos.

Convit y col. realizan una prueba intradérmica previa a la aplicación de los promastigotes+BCG. La cantidad usada en la primera dosis de BCG estuvo en función de la respuesta del paciente a una prueba de tuberculina leída a las 48 horas, realizada previa a la vacunación. Cuando el diámetro de la induración era menor de 10 mm, inyectaron 0,2 mg de BCG, cuando el diámetro estaba entre 10 y 20 mm inyectaron 0,02 mg y cuando estaba por encima de 20 mm inyectaron 0,01 mg. En dosis posteriores usaron 0,1 mg de BCG (23).

La mezcla era preparada al momento de usarse y se inyectaba por vía intradérmica la mitad de la dosis en cada región deltoidea (0,25 ml en cada uno de los dos sitios, es decir dos inoculaciones por

dosis). La segunda dosis era administrada 6-8 semanas y la tercera dosis 12-18 semanas después (23). Este procedimiento suma a la variabilidad de las cepas de BCG, la variabilidad en la respuesta inmunitaria de las personas tratadas, igual a lo observado con diferentes cepas de ratones (34,38) pues la respuesta protectora de los pacientes varía según la dosis de BCG que se use en cada caso. Quizás esto también ayude a explicar el alto porcentaje de pacientes con ausencia de curación clínica de la enfermedad.

Para interpretar el efecto de distintas dosis de BCG es menester entender el concepto del fenómeno "variación de fase". Este puede definirse mejor como la ausencia de una verdadera relación dosis-respuesta entre dosis crecientes del adyuvante (BCG u otros) y la respuesta inmunitaria del hospedero vertebrado contra un reto antigénico específico.

El fenómeno se caracteriza porque al producir pequeños cambios en la dosis de adyuvante se induce un cambio de fase de la respuesta inmune del hospedero vertebrado, a saber: la respuesta inmunitaria cambia de una estimulación (positiva) a una supresión (negativa) comparada con la respuesta inmunitaria obtenida sin el adyuvante.

Como el parámetro dosis actúa como una variable continua es posible obtener diferentes grados de estimulación y supresión de la respuesta inmune, así como un rango de dosis donde no se observa efecto alguno.

Utilizando el tumor LMC1 en ratas Lewis se estudió el efecto de distintas dosis (200-2 000 μg) de BCG inyectado por vía i.v. en el animal 12 días antes del implante del tumor. En el máximo de estimulación 250 μg de BCG) el crecimiento del tumor se redujo de 2 300 mm^2 a 600 mm^2 y la sobrevida del huésped aumentó de 0 a 70%. Por encima de 250 μg de BCG se encontró inmunosupresión aumentando tanto el crecimiento del tumor de 2 300 mm^2 a 3 800 mm^2 , como también la mortalidad de los animales a un 100%. Por encima de 750 μg de BCG se obtuvo de nuevo un efecto beneficioso disminuyendo el tumor de 2 000 mm^2 a 900 mm^2 aumentando la sobrevida del huésped a 60% (61).

Estos experimentos pueden explicar la variabilidad tan grande de la respuesta protectora contra la leishmaniasis cutánea observada en los pacientes con leishmaniasis, pues es muy difícil en el ser humano calcular la dosis exacta de BCG que corresponda a las cantidades de BCG inductoras de

protección y no a las cantidades correspondientes al rango de supresión de la respuesta inmune. Convit y col. lo realizan mediante una intradermoreacción cuya validez cuantitativa para inferir y extrapolar la dosis protectora de BCG a ser administrada al paciente no es confiable por ser impredecible (23).

La inyección de promastigotes+BCG deja nódulos y cicatrices visibles y persistentes en el sitio de la inoculación.

Convit y col. reportan como complicaciones "ligeras" de la inyección de promastigotes +BCG: necrosis y ulceración en el sitio de la inoculación entre 1,5-1,9 cm de diámetro, complicaciones "moderadas": úlceras entre 2-3 cm de diámetro con inflamación ganglionar regional que no requirieron tratamiento específico y complicaciones "severas": úlceras mayores de 3 cm muy profundas con efectos sistémicos. En la serie estudiada por ellos reportan que los efectos secundarios fueron todos "ligeros" alcanzando al 5,8% de los pacientes tratados. El diámetro de las cicatrices en las escaras después de la primera dosis de inmunoterapia fue de $5,08 \pm 2,04$ mm, después de la segunda dosis $4,68 \pm 1,26$ mm y después de la tercera dosis $3,79 \pm 0,82$ mm (23).

En nuestro estudio la presencia de nódulos y cicatrices (Figuras 21 a 25) alcanzó al 89 % de los pacientes tratados con promastigotes+BCG, con un diámetro promedio similar al reportado por Convit y col. (22) en la primera dosis de tratamiento, pero con un rango de variabilidad muy grande (1-14 mm). El mayor porcentaje de efectos secundarios observados en los pacientes analizados por nosotros quizás se deba al alto número de personas con ausencia de remisión de las lesiones los cuales recibieron mayor número de inyecciones s.c. de promastigotes+BCG.

Convit y col. no encuentran cambios estadísticamente significativos en la reactividad inmunitaria del grupo de pacientes tratado con inmunoterapia ni tampoco en el grupo tratado con Glucantime siendo la variación en la IDR de los pacientes desde $21,88 \pm 9,14$ mm (promastigotes+BCG) y $20,50 \pm 8,02$ mm (quimioterapia) antes del tratamiento hasta $26,8 \pm 8,72$ mm (promastigotes+BCG) y $24,7 \pm 8,71$ mm (quimioterapia) después del tratamiento (23).

En nuestro trabajo, usando las proteínas de amastigotes como antígeno para la IDR, hemos encontrado que las personas tratadas con promastigotes+BCG tienen una IDR de diámetro mayor con diferencias significativas ($p = 0,0001$) al compararla con los valores obtenidos en los otros grupos estudiados.

Ello quizás se deba a la inyección s.c. del antígeno, la cual estimula preferencialmente la sensibilidad cutánea como hemos discutido en párrafos anteriores.

Es menester recordar los experimentos en animales ya mencionados donde la inyección del parásito por vía s.c. induce una exacerbación de la enfermedad y el bloqueo de la respuesta inmunitaria protectora, obtenida con la inyección parenteral de los parásitos irradiados a pesar de una IDR positiva. Estas conclusiones contraindican una vez más el uso de promastigotes+BCG por la vía s.c. en seres humanos.

En Brasil, Mayrink y col. han usado los promastigotes muertos sin BCG para tratar la leishmaniasis cutánea. El tratamiento fue administrado por vía i.m. profunda. El primer curso de tratamiento consistió: primer 1° día 24 µg, 2° día 48 µg, 3° día 72 µg, 4° día 96 µg, 5° - 10° día 120 µg. Después del primer curso de tratamiento, 10 días de descanso y luego 10 días de tratamiento recibiendo 120 µg diarios (500 µl). Un curso de tratamiento se considera 10 días de tratamiento y 10 días de descanso (24).

El 82% de los pacientes curados recibió un promedio de 7 200 µg de promastigotes (2-10 cursos de tratamiento, entre 20-100 inyecciones i.m., durante un tiempo de 5,7-28,57 semanas) y el 17,6% recibió 36 480 µg (11-19 cursos de tratamiento, entre 110 y 190 inyecciones i.m., durante 31,42-54,28 semanas). El 88% de los pacientes con lesiones cutáneas múltiples mostró remisión clínica con 28 320 µg, el 75% de los pacientes con leishmaniasis muco-cutánea con 8 160 µg, mientras que el 24% de los pacientes no respondió a las inyecciones de promastigotes y ameritó tratamiento con Glucantime (24).

Creemos que el número de dosis de promastigotes muertos para obtener la remisión clínica de las lesiones en los trabajos de Mayrink y col. es exageradamente alto (100-200 inyecciones), en contraste con las proteínas de amastigotes de nuestra vacuna que con sólo $8,1 \pm 6,5$ dosis en promedio indujeron la remisión clínica de las lesiones. Ello significa que los antígenos de Mayrink y col. son de baja inmunogenicidad de allí la gran cantidad de proteína (7 - 28 mg) que es necesario inocular a los pacientes con leishmaniasis cutánea.

Otro punto a considerar para explicar la falta de eficiencia de los promastigotes completos en los preparados terapéuticos usados hasta ahora tanto en Brasil (24) como en Venezuela (23) es la presencia en los parásitos de factores inmunosupresores.

Rodrigues y col. en 1987 describieron el glico-conjugado gp10/20 purificado de **L amazonensis** el cual, al inyectarlo a ratones por vía s.c. o i.p. induce una respuesta de sensibilidad retardada a los antígenos del parásito, un aumento significativo en el tamaño de la lesión y el empeoramiento de la enfermedad en los animales infectados posteriormente con el parásito leishmánico. Encontraron también que el efecto del gp 10/20 es mediado por una célula T de fenotipo L3T4+ la cual transfiere tanto el efecto del aumento del tamaño de la lesión como la aparición de sensibilidad retardada a los antígenos del parásito a ratones receptores normales singénicos (62).

Estos experimentos son una prueba más de que no deben usarse parásitos completos para la profilaxia o tratamiento de la leishmaniasis en seres humanos pues estamos inyectando fracciones inmunosupresoras que sensibilizarán a las células T e inducirán un aumento de la lesión y el empeoramiento de la enfermedad.

Castés y col. en 1994 analizan la respuesta inmunitaria celular en voluntarios sanos vacunados con la mezcla de promastigotes muertos por calor + BCG, inyectados por vía s.c. Utilizan 208 personas doblemente negativas al PPD y al antígeno leishmánico (promastigotes tratados con autoclave). El universo en estudio fue dividido en cuatro grupos que recibieron: 1- Promastigotes de una cepa de **L amazonensis** (cepa MEL) muertos por calor + BCG (n=68); 2-BCG (cepa Copenhagen) solamente (n=47); 3- Promastigotes muertos por calor solamente (n=47); 4- El diluyente (solución salina) como placebo (n=46), (61). El número de parásitos inoculados y la manera de administrar el BCG ya se han descrito en una referencia anterior (23). Los períodos de observación de los resultados se dividieron en: 1-Tiempo 0, antes de la vacunación cuando se aplica la primera dosis de vacuna; 2-Tiempo 1 cuando se administra la segunda dosis de vacuna a los 45-75 días de la primera dosis, 3-Tiempo 2 cuando se inyecta la tercera dosis de vacuna entre 62-196 días de la primera dosis, 4-Tiempo 3 a los 54-328 días de la primera dosis; y 5-Tiempo 4 a los 141-644 días de la primera dosis de vacuna. Como puede observarse en este trabajo existe una gran variabilidad en el tiempo de aplicación de las dosis de vacuna y también en el tiempo de seguimiento de los pacientes vacunados, lo cual dificulta la interpretación de los resultados introduciendo un rango muy amplio en los valores

obtenidos en cada paciente estudiado. La variación en estos parámetros de tiempo de vacunación y seguimiento es atribuido por los autores a problemas logísticos y a la insurgencia popular ocurrida el 27 de febrero de 1989 en Caracas (63).

Los autores observan en los pacientes de los cuatro grupos un aumento en la respuesta intradérmica al retarlos con todos los antígenos empleados para la inmunización a los tiempos 3 y 4 en comparación con el tiempo 0, siendo mayor el incremento de la IDR al usar PPD que al emplear los antígenos leishmánicos.

En las figuras publicadas en el trabajo se observa que la respuesta de las personas vacunadas con promastigotes+BCG y de los individuos vacunados con BCG solo, al tiempo 4 es igual y de un valor mayor que la respuesta de las personas vacunadas con promastigotes solos o con placebo. Por cierto, extraña el que estos dos últimos grupos de vacunación (promastigotes solos y placebo) mostraron una respuesta idéntica a la intradermoreacción con PPD (63).

En el caso de usar antígenos leishmánicos (promastigotes muertos mediante autoclave) todos los grupos respondieron con una IDR similar, incluyendo el placebo a los tiempos 3 y 4. Sólo al tiempo 3 se encontraron diferencias significativas en los valores de la IDR entre los pacientes que recibieron la mezcla de promastigotes+BCG y el resto de los grupos (63). Aquí vemos de nuevo la inmensa variabilidad en la respuesta inmunitaria que ya hemos discutido en párrafos precedentes.

El 80% de las personas que recibieron promastigotes + BCG o BCG solo respondieron al PPD intradérmico, porcentaje que disminuye a 60% en el grupo que recibió promastigotes solos y en los que recibieron placebo al tiempo 4. Al probar los antígenos leishmánicos, sólo el 30-40% mostró positividad al tiempo 4 pues la conversión fue muy baja al tiempo 3 (40% los que recibieron promastigotes+BCG y menos del 20% el resto de los grupos) Esto nos indica que la respuesta de inmunidad celular en los grupos vacunados es en general muy baja (63).

Los índices de estimulación linfocitaria fueron menores que en pacientes con leishmaniasis cutánea y muy variables en los distintos tiempos de observación. El número de personas con respuesta blastogénica positiva al PPD disminuyó a 20% o menos en todos los grupos al tiempo 3, aumentando entre 40-60% al tiempo 4. Al usar los antígenos

leishmánicos la respuesta fue menor del 40% de las personas al tiempo 3 y 4 en todos los grupos, aumentando en el tiempo 4 a 60% en los grupos que recibieron promastigotes+BCG o promastigotes solos. Es decir, existe una supresión de la respuesta linfocitaria después de la tercera dosis de promastigotes +BCG (63).

La estimulación con PPD indujo la producción de interferon- γ en todos los grupos incluyendo el placebo. La magnitud fue similar al tiempo 4 en vacunados con promastigotes +BCG y en los que recibieron BCG solo. La respuesta fue también igual en los vacunados con promastigotes solos y placebo.

La respuesta de interferon- γ al estimular con antígeno leishmánico fue muy baja, menor al 30% en todos los grupos en todos los tiempos analizados en el trabajo de estos autores. Los porcentajes de respondedores también bajaron a 40% o menos al tiempo 3 en todos los grupos tanto al estimular con PPD como con antígeno leishmánico aumentando a 40-60% en todos los grupos incluyendo el placebo al tiempo 4. Es decir, se repite la inmunosupresión ya observada en el experimento de la estimulación linfocitaria después de la tercera dosis de promastigotes + BCG (63).

El efecto observado con el PPD en los grupos que no recibieron BCG es debido, según los autores, a la exposición ambiental de las personas a los antígenos de las micobacterias o también quizás a la respuesta inducida por las intradermoreacciones realizadas en los pacientes al tiempo 0 y al tiempo 3. Sin embargo, en todo el experimento el porcentaje máximo de conversión a IDR positiva con antígenos de leishmania fue de 37,5% y estos pacientes también recibieron intradermoreacciones con antígeno leishmánico. También es complicado explicar en estos experimentos el que 85% de los vacunados de los grupos con promastigotes+BCG o con promastigotes solos, tenían alguna forma de respuesta celular a los antígenos de leishmania 12-18 meses después de la vacunación en ausencia de una respuesta intradérmica positiva. Los autores postulan antígenos cruzados entre BCG y leishmania para explicar sus resultados (63).

En todo este trabajo los autores no reportan la incidencia de leishmaniasis en los grupos vacunados con las distintas preparaciones ya nombradas, por lo cual es muy difícil relacionar los distintos procedimientos empleados con la respuesta inmunitaria del paciente a la infección.

Por otra parte, se desconoce si tal o cual procedimiento fue o no efectivo en la protección contra la enfermedad, lo cual impide llegar a conclusiones sobre la relevancia de los resultados y sobre la aplicación futura a seres humanos de tal o cual método de vacunación (63). No debemos olvidar que existe una evidencia clara de inmunosupresión después de la tercera dosis de promastigotes+BCG.

Sharples y col. en 1994, usan el mismo grupo de pacientes vacunados con las preparaciones ya detalladas en la referencia de Castés y col. y analizan los niveles de anticuerpos anti-BCG, anti-PPD, anti-**M leprae** y anti-**L mexicana** por el método de ELISA en los 4 grupos vacunados (64). Estos autores encuentran que la presencia de promastigotes muertos en la inoculación de promastigotes+BCG, suprime la respuesta humoral al BCG medido en la placa de BCG-ELISA, así como también la respuesta humoral al PPD. La presencia de promastigotes muertos suprime cualquier respuesta potencial de anticuerpos al PPD en el grupo vacunado con promastigotes+BCG y, al tiempo 2 se vió una disminución significativa en las unidades de anticuerpos en los pacientes así tratados (64).

En el caso de usar **M leprae** como antígeno, los grupos vacunados con promastigotes + BCG y con BCG solo, mostraron aumento en las unidades de anticuerpos anti **M leprae** al tiempo de la segunda y tercera vacuna, incremento que desapareció 1 año después de la vacunación. En este caso la adición de parásitos muertos no tuvo efecto en los niveles de anticuerpos al compararlos con el grupo que recibió BCG solo (64).

Al analizar los anticuerpos anti-leishmania se encontró un patrón similar en todos los grupos vacunados (incluyendo al placebo), indicativo según los autores, de variaciones estacionales independientes de la condición de vacunación. También piensan que los distintos grupos pueden estar respondiendo al antígeno de los promastigotes presente en las pruebas intradérmicas antes de la vacunación y al tiempo 3 después de la tercera dosis de vacuna (64).

Sin embargo, esta última explicación de la variación estacional no es posible aplicarla a los resultados obtenidos con los anticuerpos antimicobacterias, donde los pacientes también recibieron pruebas intradérmicas con PPD y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los que tuvieron respuestas positivas en los 4 grupos vacunados, incluyendo a los que

recibieron placebo. Es importante notar que todos los grupos produjeron niveles de anticuerpos menores que los encontrados en pacientes con leishmaniasis utilizados como control (64).

Los niveles de IgG anti-leishmania aumentaron en todos los grupos vacunados independientemente de si el antígeno leishmania estaba o no incluido en la inoculación. Este patrón para los autores es sugestivo de un ciclo estacional en respuesta a la exposición endémica a los antígenos leishmánicos (64).

La presencia de antígenos de leishmania en el grupo vacunado con promastigotes+ BCG suprime la respuesta de anticuerpos al **M bovis / M tuberculosis** y, por otra parte, aumenta el número de personas que responden positivamente con IgG anti-leishmania. De nuevo los autores consideran que esta respuesta está relacionada con la exposición a antígenos de leishmania presentes en el área endémica o a una respuesta a las intradermoreacciones practicadas en los distintos pacientes con anterioridad, más bien que relacionados con las vacunas administradas a los pacientes (64).

Los autores sugieren que la administración de BCG podría conducir a una respuesta que exacerbaría la enfermedad asociada a la presencia de anticuerpos y células TH2 en los individuos vacunados. De nuevo, a pesar de que los autores invocan la exposición de los pacientes a la infección leishmánica presente en el área endémica para explicar sus resultados, no suministran la incidencia de la enfermedad en los grupos vacunados con las distintas preparaciones por lo cual es muy difícil llegar a conclusiones ciertas sobre los procedimientos de vacunación empleados en los distintos pacientes estudiados (64).

Todos los trabajos tanto en animales experimentales como en humanos aquí citados, nos permiten concluir, que la mezcla de promastigotes muertos por calor + BCG no debe ser utilizada en seres humanos como ha sido propuesto por Convit y col. (23,63-65).

CONCLUSIONES

1. La inyección de BCG en animales experimentales después de la infección con **Leishmania mexicana** induce un crecimiento acelerado de las lesiones así como la aparición de

- metástasis cutáneas (38).
2. En los experimentos con animales donde se reporta protección contra la leishmaniasis experimental usan como antígeno amastigotes +BCG y no promastigotes+BCG. Sin embargo, siempre encuentran parásitos abundantes en los ganglios linfáticos que drenan la lesión (18).
 3. El BCG administrado antes de la infección experimental con **Leishmania trópica** induce en los animales una reducción moderada de la enfermedad cutánea, pero siempre se encuentran parásitos abundantes en los ganglios linfáticos que drenan la lesión (16).
 4. La mezcla de **Mycobacterium leprae** + BCG no da al paciente lepromatoso una protección mejor que el BCG solo, el cual por sí mismo confiere una protección substancial contra la lepra (22).
 5. Los promastigotes irradiados de **Leishmania enrietti** inyectados por vía subcutánea son incapaces de proteger a cobayos contra la infección leishmánica (33).
 6. Promastigotes irradiados de **Leishmania major** inyectados por vía s.c no protegen contra la leishmaniasis experimental y destruyen la acción protectora de los mismos promastigotes inyectados por vía intravenosa. El bloqueo de la acción protectora también se obtiene con promastigotes muertos por calor, formol o sonicación inyectados por vía subcutánea (34).
 7. La inmunización con formas avirulentas de **Leishmania major** por vía subcutánea conduce a la exacerbación de la leishmaniasis experimental (37).
 8. El BCG solo induce en ratones, un 45% de reducción en el tamaño de la lesión leishmánica pero al añadirle promastigotes muertos la reducción en el tamaño de la lesión es solo de 18% (38).
 9. Las muestras de BCG de origen diferente tienen inmunogenicidad (49-53) y virulencia (54) variables y se han publicado estudios de campo donde se demuestra que el BCG no protege contra la tuberculosis humana (43-46, 48).
 10. Es necesario realizar la búsqueda del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) antes de aplicar el BCG en la población, pues se tiene el riesgo de una infección tuberculosa generalizada (58) .
 11. Los ratones DBA/2 resistentes a la infección por BCG y también resistentes a la infección experimental por **Leishmania amazonensis**, al ser inmunizados con parásitos + BCG muestran una exacerbación de la enfermedad (60).
 12. El BCG muestra el fenómeno de “variación de fase” en el animal vertebrado. Existen dosis de BCG que inducen un efecto protector, mientras que otras cuantitativamente muy cerca de las primeras, provocan un efecto inmunosupresor y por ende exacerbación de la leishmaniasis cutánea. La dosis que induce uno u otro efecto es imposible de cuantificar en seres humanos (61).
 13. La inyección subcutánea de promastigotes +BCG induce efectos indeseables en el sitio de la inoculación y cicatrices de aspecto queiloideo en la úlcera leishmánica primaria.
 14. La vacuna polivalente con promastigotes muertos usada en Brasil es de baja inmunogenicidad, requiriendo en seres humanos una cantidad exagerada de dosis para obtener la remisión clínica de las lesiones leishmánicas (24).
 15. Los promastigotes completos poseen fracciones inmunosupresoras que inducen la exacerbación de la leishmaniasis cutánea (62).
 16. Los trabajos que evalúan la inmunidad humoral y celular en pacientes tratados con promastigotes+BCG no presentan evidencias (63,64) que sirvan de base para la aplicación de este tratamiento a seres humanos (65).
 17. En la región hiperendémica de leishmaniasis de “La Planta”, en Guatire, Edo. Miranda, el 23,2% de los pacientes leishmánicos sometidos a tratamiento con promastigotes +BCG no mostraron remisión clínica de las lesiones y en el 39,5% de las personas tratadas que clínicamente remitieron, aparecieron recidivas de la enfermedad a los 4 años de su aparente curación. Es decir el 62,7% de las personas tratadas con promastigotes+BCG no mostraron protección contra la leishmaniasis cutánea.
 18. Los pacientes leishmánicos tratados con proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias sin BCG, presentaron 100%

de remisión clínica de las lesiones. Hasta ahora no hemos encontrado en 24 meses de observación recidivas de la enfermedad ni tampoco efectos ni secuelas indeseables en los pacientes tratados.

19. No estamos de acuerdo en que la mezcla de promastigotes muertos por calor + BCG se aplique a seres humanos para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.
20. Hemos solicitado que la Academia Nacional de Medicina intervenga en la solución de este problema que afecta la salud de los venezolanos.

REFERENCIAS

1. Wright AE. Notes on the treatment of furunculosis, sycosis and acne by the inoculation of a staphylococcus vaccine. *Lancet* 1902;29:874-884.
2. Di Cristina L, Caronia G. Primi tentativi di vaccinazione graduale nell'anemia da *Leishmania* con culture morte. *Trop Dis Bull* 1912;40:297 (Abstract).
3. Row R. Curative value of *Leishmania* culture vaccine in Oriental sore. *Br Med J* 1912;9:540-541.
4. Dubovsky P. Vaccinotherapy of cutaneous leishmaniasis. *Trop Dis Bull* 1943;40:297 (Abstract).
5. Gaspar Vianna A. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injectes intravenosas de tártaro emético. *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia* 1912;4: 426-428.
6. Bergam JD, Edwards N, King M, Grogl M. Biochemistry of pentostame resistant *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40: 159-164.
7. Grogl M, Oduola AML, Cordeiro LDC, Kule DE. ***Leishmania* sp.:** development of pentostame-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp Parasitol* 1989;69:78-90.
8. Preston PM, Carter RL, Leuchars E, Davies AJS, Dumonde DC. Experimental cutaneous leishmaniasis III. Effect of thymectomy on the course of infection of CBA mice with ***Leishmania trópica***. *Clin Exp Immunol* 1972;10:337-343.
9. Nacy CA, Fortier AH, Pappas MG, Henry RR. Susceptibility of inbred mice to ***Leishmania tropica*** infection: correlation of susceptibility with in vitro defective macrophage microbicidal activities. *Cell Immunol* 1983;77:298-307.
10. Nacy CA, Meltzer MS, Fortier AH. Macrophage activation to kill *leishmania tropica*: characterization of P/J mouse macrophage defects for lymphokine induce antimicrobial activities against ***Leishmania tropica*** amastigotes. *J Immunol* 1984;133:3344-3350.
11. Scott PA, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Non-specific immunodepression in BALB/c mice infected with ***Leishmania tropica***. *J Immunol* 1981;187:2395-2400.
12. Sadick MD, Locksley RM, Tubbs C, Raff HV. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon- γ in response to ***Leishmania*** antigens in vitro. *J Immunol* 1986;136:655-660.
13. Blanden RV, Lefford MJ, Mackaness GB. The host response to Calmette-Guerin Bacillus infection in mice. *J Exp Med* 1969;129:1079-1101.
14. Ratzan KR, Musher DM, Keusch GT, Weinstein L. Correlation of increased metabolic activity, resistance to infection, enhanced phagocytosis and inhibition of bacterial growth by macrophages from listeria and BVG-infected mice. *Infect Immun* 1972;5:499-506.
15. Mackaness GB, Lagrange PH, Ishibashi T. The modifying effect of BCG on the immunological induction of T cells. *J Exp Med* 1974;139:1540-1552.
16. Weintraub J, Weinbaum FI. The effect of BCG on experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *J Immunol* 1977;118:2288-2290.
17. Grimaldi GF, Moriearty PL, Hoff R. ***Leishmania mexicana*** in C3H mice: BCG and levamisole treatment of established infections. *Clin Exp Immunol* 1980;41: 237-242.
18. Fortier AH, Mock BA, Meltzer MS, Nacy CA. Mycobacterium bovis BCG-induced protection against cutaneous and systemic *Leishmania major* infections of mice. *Infect Immun* 1987;55:1707-1714.
19. Hanks JH, Fernández JM. Enhancement of resistance to murine leprosy by BCG plus specific antigen. *Internat J Leprosy* 1956;24:65-73.
20. Convit J, Pinardi ME, Rodríguez Ochoa G, Ulrich M, Avila JL, Gohman M. Elimination of ***Mycobacterium leprae*** subsequent to local in vivo activation of macrophages in lepromatous leprosy by other mycobacteria. *Clin Exp Immunol* 1974;17:261-265.
21. Convit J, Ulrich M, Aranzazu N, Castellanos PL, Pinardi ME, Reyes O. The development of a vaccination model using two microorganisms and its application in leprosy and leishmaniasis *Lepr Rev* 1986;57:(suppl 2):263s-273s.
22. Convit J, Sampson C, Zúñiga M, Smith PG, Plata J, Silva J, Molina J, Pinardi ME, Bloom BR, Salgado A. Immunoprophylactic trial with combined ***Mycobacterium leprae***/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. *Lancet* 1992;339:446-450.
23. Convit J, Rondon A, Ulrich M, Bloom B, Castellanos

- PL, Pinardi ME, Castes M, García L. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987;1:401-404.
24. Mayrink W, Magalhaes PA, Michalick MSM, Da Costa CA, De Oliveira Lima A, Melo MN, Toledo VPCP, Nascimen E, Dias M, Genaro O, Hermeto MV, Williams P. Immunotherapy as a treatment of American Cutaneous Leishmaniasis: Preliminary studies in Brazil. *Parassitologia* 1992;34:159-165.
 25. O'Daly JA, Rodríguez MB, Goa I, Ovalles T. Factores de crecimiento y diferenciación de varias cepas de Leishmanias. Desarrollo de medios de cultivo químicamente definidos. *Gac Méd Caracas* 1989;96:15-30.
 26. O'Daly JA, Rodríguez MB. Differential growth requirements of several *Leishmania* spp. in chemically defined culture media. *Acta Tropica (Basilea)* 1988;45:109-126.
 27. O'Daly JA, Cabrera Z. Immunization of hamsters with TLCK-killed parasites induces protection against **Leishmania** infection. *Acta Tropica (Basilea)* 1986;43:225-236.
 28. O'Daly JA, Cabrera Z. Una vacuna contra la leishmaniasis cutánea y visceral. *Gac Méd Caracas* 1985;93:17-61.
 29. O'Daly JA, Spinetti H, Rodríguez MB, Acuña L, García P, Castillo LM, Ovalles T, Zambrano L, Yanes A, Iannello JG, García R, Papapietro A, Zamora C, Salinas O. Proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias protegen a seres humanos contra la leishmaniasis en el área endémica de Guatire, Estado Miranda, Venezuela. *Gac Med Caracas* 1995;103:133-177
 30. O'Daly JA, Polanco N. Variability of **Trypanosoma cruzi** epimastigote surface antigens with changes in the temperature of the cultures. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:44-51.
 31. O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodriguez MB. A study of Chagasic and non-chagasic miocardiopathies by ELISA and Immunoblotting with **Trypanosoma cruzi** and **Trypanosoma rangeli** antigens. *Acta Tropica (Basilea)* 1994;56:265-287.
 32. Lowry O, Rosebrough V, Farr L, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
 33. Lemma A, Cole L. **Leishmania enrietti**: radiation effects and evaluation of radioattenuated organisms for vaccination. *Exp Parasitol* 1974;35:161-169.
 34. Liew FY, Hale C, Howard JG. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *J Immunol* 1985;135:2095-2101.
 35. Liew FY, Singleton A, Cillari E, Howard JG. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis V. Mechanism of the anti-protective blocking effect induced by subcutaneous immunization against *Leishmania major* infection. *J Immunol* 1985;135:2102-2107.
 36. Liew FY. Regulation of delayed-type hypersensitivity to pathogens and alloantigens. *Immunol Today* 1982;3:18-23.
 37. McGurn M, Boon T, Louis JA, Titus RG. *Leishmania major*: Nature of immunity induced by immunization with a mutagenized avirulent clone of the parasite in mice. *Exp Parasitol* 1990;71:81-89.
 38. Rivier D, Shah R, Bovay P, Mauel J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunol* 1993;15:75-84.
 39. BCG vaccine: a reappraisal of efficacy. *WHO Drug Information* 1994;8:46-48.
 40. ten Dam H, Hitze K. Does BCG vaccination protect the newborn and young infants? *Bull W H O* 1980;58:37-41.
 41. Bergdahl S, Fellander M, Robertson B. BCG osteomyelitis: experience in the Stockholm region over the years 1961-1974. *J Bone Joint Surg* 1976;58B:212-216.
 42. Wasz-Hockert O, Backman A, Lotte A. y col. Osteitis caused by BCG vaccination of the newborn. *Bull Int Union Against Tuberculosis* 1979;54:325-328.
 43. Tuberculosis Prevention Trial. Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report. *Bull W H O* 1979;57:819-827.
 44. Tuberculosis Prevention Trial, Madras. Trial of BCG vaccines in South India for tuberculosis prevention. *Indian J Med Research* 1980;72(suppl):1s-74s
 45. Editorial. BCG: bad news from India. *Lancet*. 1980;1:73-74.
 46. Editorial. BCG vaccination after the Madras study. *Lancet* 1981;1:1309-1310.
 47. Colditz G, Brewer T, Berkey C, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HJ, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis; meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271:698-702.
 48. Comstock G, Livesay V, Woolpert S. Evaluation of BCG vaccination among Puerto Rican children. *Am J Pub Health* 1974;64:283-291.
 49. Vallishayee R, Shasidhara A, Bunch-Christensen K, Guld J. Tuberculin sensitivity and skin lesions in children after vaccination with 11 different BCG strains. *Bull W H O* 1974;51:489-494.

50. Ladefoged A y col. Tuberculin sensitivity in guinea pigs after vaccination with varying doses of BCG in 12 different strains. *Bull W H O* 1964;53:435-443.
51. Dubos P, Pierce C. Differential characteristics in vitro and in vivo of several substrains of BCG. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1956;74:699-714.
52. Willis H, Vandiviere M, Vandiviere MR, Melvin I. Studies in tuberculo-immunity. *Am J Med Sc* 1960; 240:137-158.
53. Willis H, Vandiviere M. The heterogeneity of BCG. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1961;84:288-290.
54. Mitchinson D. The virulence of tubercle bacilli from patients with pulmonary tuberculosis in India and other countries. *Bull Int Unit Tuber* 1964;35:287-306.
55. Miceli Y, De Kanto Y, Colaiacovo D, Peluffo G, Cutillo Y, Gorra R, et al. Evaluation of the effectiveness of BCG vaccination using the case-control method in Buenos Aires, Argentina. *Int J Epidemiol* 1988;17:629-634.
56. Sirinavin S, Chotpitayasunondh T, Suwanjutha S. Protective effect of neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:350-365.
57. Young T, Hershfield E. A case-control study to evaluate the effectiveness of mass neonatal BCG vaccination among Canadian Indians. *Am J Pub Health* 1986; 76:783-786
58. Jewett J, Hecht F. Preventive health care of adults with HIV infection. *JAMA* 1993;269:1144-1153
59. Buschman E, Skamene E. Immunological consequences of innate resistance and susceptibility to BCG. *Immunol Lett* 1988;19:199-210.
60. Da Silva Calabrese K, Goncalves Da Costa SC. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1992;87:49-56.
61. Davies M. Phase variations in the modulation of the immune response. *Immunol Today* 1983;4:103-106.
62. Rodrigues MM, Previato LM, Charlab R, Barcinski MA. The cellular immune response to a purified antigen from *Leishmania mexicana subsp. amazonensis* enhances the size of the leishmanial lesion on susceptible mice. *Infect Immun* 1987;55:3142-3148.
63. Castés M, Blackwell J, Trujillo D, Formica S, Cabrera M, Zorrilla G, Rodas A, Castellanos PL, Convit J. Immune response in healthy volunteers vaccinated with killed leishmanial promastigotes plus BCG. I: Skin test reactivity, T-cell proliferation and interferon- γ production. *Vaccine* 1994;12:1041-1051.
64. Sharples CE, Shaw MA, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed leishmanial promastigotes: antibody responses to mycobacterial and leishmanial antigens. *Vaccine* 1994;12:1402-1412.
65. Convit J, Castellanos PL, Ulrich M, Castés M, Rondón A, Pinardi ME, Rodríguez N, Bloom BR, Formica S, Valecillos L, Breñaña A. Immunotherapy of localized, intermediate and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989;160:104-115.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Raicy Galavis por la revisión del manuscrito. Este trabajo ha sido financiado por el CONICIT, proyecto RPIV-1200030, el "UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases", Proyecto N° 910694 y donaciones privadas al "Fondo para una vacuna contra la Leishmaniasis". También quisiéramos agradecer a los habitantes de la zona de "El Ingenio" por la ayuda prestada en la organización de la vacunación. La ayuda recibida por el departamento de transporte en la persona del Sr. José Angel Peña y por el personal del departamento de fotografía del IVIC en las personas de Mardonio Díaz Bello y Jorge Luis Rivas ha sido invaluable.