



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGÍA Y SIFILOGRAFÍA
HOSPITAL VARGAS DE CARACAS

**MORFOMETRÍA DIGITAL Y PATRONES HISTÓLOGICOS EN LAS FORMAS
ACTIVAS DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA AMERICANA**

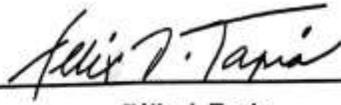
Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al título de Especialista en
Dermatología y Sifilografía

Figuroa Polanco, Natiant Sofía.

Vásquez Chirinos, Mariaesther de la Guadalupe.

Tutor: Félix J. Tapia

Caracas, 04 de diciembre de 2018



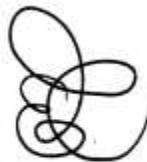
Félix J. Tapia

Tutor



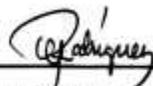
Ricardo Pérez Alfonso

Director del Programa de Especialización en Dermatología y Sifilografía



Elsy Cavallera

Coordinador Académico del Programa de Especialización en Dermatología y Sifilografía



Orquidea L. Rodríguez G.

Asesor

DEDICATORIA

A nuestro Dios, quien nos regaló el don de la vida.

A nuestra Buena Madre, quien nos ha protegido bajo su manto en este caminar.

A nuestras familias, pilares fundamentales de nuestra existencia.

A nuestros pacientes, razón fundamental de nuestra profesión y estilo de vida.

A nuestro querido Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit quien ha sido nuestro techo y hogar durante tres largos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
MÉTODOS	29
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	43
REFERENCIAS	48
ANEXOS	53

MORFOMETRÍA DIGITAL Y PATRONES HISTOLÓGICOS EN LAS FORMAS ACTIVAS DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA AMERICANA

Natiant Sofía Figueroa Polanco, C.I. 18.248.859. Sexo: Femenino.
Correo electrónico: natiant.sf@gmail.com. **Teléfonos:** 0414-8776392. **Dirección:**
Hospital Vargas de Caracas.

Programa de Especialización en Dermatología y Sifilografía.
Mariaesther de la G. Vásquez Chirinos, C.I. 17.667.182. Sexo: Femenino.
Correo electrónico: dra.mariaesther.vch@gmail.com. **Teléfonos:** 0414-6932998.

Dirección: Hospital Vargas de Caracas.
Programa de Especialización en Dermatología y Sifilografía.
Tutor: Félix J. Tapia, C.I. 3.661.973. Sexo: Masculino.
Correo electrónico: felix.tapia@gmail.com. **Teléfono:** 0414-1548931.
Dirección: Hospital Vargas de Caracas.
Biólogo celular, inmunólogo.

RESUMEN

Introducción: La leishmaniasis cutánea americana (LCA) es una enfermedad producida por protozoos del género *Leishmania*; de baja patogenicidad, morbilidad relativa y de alta prevalencia, incluyendo Venezuela. Esta investigación no solo podría ofrecer índices morfométricos basados en aspectos histopatológicos de las lesiones de las distintas formas activas LCA, claves para una precisa orientación diagnóstica que correlacionándolos con variables clínico-epidemiológicas y parasitológicas, ofrecería posibles índices de valor pronóstico en cuanto a su evolución y probable respuesta terapéutica. **Objetivos:** Realizar una caracterización morfométrica de la lesiones cutáneas activas en pacientes con diagnóstico de LCA en todas su espectro mediante el uso del analizador de imágenes digital, ImageProPlus® versión 5.0., relacionándolo con patrones histopatológicos de Ridley, Magalhaes y Reyes Flores-Convit. **Metodología:** Estudio retrospectivo, descriptivo, analítico, de corte transversal. La muestra estuvo conformada por 54 historias médicas y biopsias de piel de pacientes con diagnóstico de LCA que acudieron a la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina (1990-2018), evaluadas por patrones y analizando morfométricamente: grosor de epidermis (E), área de infiltrado (AI) y número de granulomas (G). **Resultados:** El patrón histológico predominante según: Ridley fue el IV, Magalhaes III y IV y según Reyes-Convit GAV. Las lesiones LCM presentaron el mayor E y LCD la más delgada ($p < 0,05$). LCM presentó el mayor AI y la LCL la menor ($p < 0,001$). LCI presentó mayor G ($p < 0,05$). Se correlacionaron todas las variables a través del análisis multivariado de componentes y existió una correlación negativa entre E y leishmanina y positiva para AI y tamaño de la lesión.

Palabras claves: Leishmaniasis Cutánea Americana, clínica, epidemiología, morfometría, patrones de: Ridley, Magalhaes y Reyes Flores-Convit

DIGITAL MORPHOMETRY AND HISTOLOGICAL PATTERNS IN THE ACTIVE FORMS OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Natiant Sofía Figueroa Polanco, C.I.18.248.859. Sexo: Femenino.

Correo electrónico: natiant.sf@gmail.com. Teléfonos: 0414-8776392. Dirección: Instituto de Biomedicina.

Programa de Especialización en Dermatología y Sifilografía.

Mariaeather de la G. Vásquez Chirinos, C.I. 17.667.182. Sexo: Femenino.

Correo electrónico: dra.mariaeather.vch@gmail.com. Teléfonos: 0414-6932998. Dirección: Instituto de Biomedicina.

Programa de Especialización en Dermatología y Sifilografía.

Tutor: Félix J. Tapia, C.I. 3.661.973. Sexo: Masculino.

Correo electrónico: felix.tapia@gmail.com. Teléfono: 0414-1548931. Dirección: Instituto de Biomedicina. Biólogo celular, inmunólogo.

ABSTRACT

Background: Leishmaniasis is a group of chronic parasitic zoonotic diseases, produced by different species of hemoflagellated protozoa of the genus *Leishmania*, which can compromise skin, mucous membranes and viscera, depending on the species and the immune response of the host. It is of low pathogenicity, relative morbidity and high prevalence in many tropical and subtropical regions of the world, including our country. This research could not only offer morphometric indexes based on histopathological aspects of the lesions of the different active forms of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL), keys for a precise diagnostic orientation, but correlating them with clinical-epidemiological and parasitological variables would offer possible indexes of prognostic value to its evolution and probable therapeutic response. **Objectives:** To perform a morphometric characterization of active skin lesions in patients diagnosed with ACL in its variants: localized, mucosa-cutaneous and diffuse, using the digital image analyzer, Image Pro Plus® version 5.0 and relate it to the histopathological patterns of Ridley, Magalhaes and Reyes Flores-Convit. **Methodology:** Retrospective, descriptive, observational, cross-sectional study. The population will be made up of the medical histories and skin biopsies of patients with clinical, parasitological and histopathological diagnosis of ACL who attended the consultation of Leishmaniasis of the Clinical Dermatology section of the Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, during the period between January 1990 to January 2018, that met the pre-established inclusion criteria for this investigation. The sample was intentional and not probabilistic.

Key words: American Cutaneous Leishmaniasis, clinical, epidemiology, morphometry, patterns: Ridley, Magalhaes and Reyes Flores-Convit

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA) es una enfermedad de alta prevalencia en muchas áreas tropicales y subtropicales del continente, presente en 22 países de América, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina ⁽¹⁾, donde se han descrito diez especies de *Leishmania* que pueden producir compromiso cutáneo. ⁽²⁾ Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que el 90% de los casos de LCA se presentan en Brasil, Bolivia y Perú. ⁽³⁾ Esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública por los altos costos que representa en la esfera psicológica, social, cultural y económica tanto para el propio paciente, su entorno familiar como para los gobiernos. Todos estos aspectos son de gran impacto para que la leishmaniasis, conjuntamente con la tripanosomiasis africana y el dengue, sean consideradas dentro de la categoría 1 por la OMS para la investigación de nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento, a través del programa de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales. ⁽⁴⁾

La Leishmaniasis sigue siendo una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo, y afecta predominantemente a los más pobres, sobre todo en los países en desarrollo; se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraerla, y cada año se producen más de 2 millones de casos nuevos. ^(1,5)

Planteamiento y delimitación del problema

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por unas 20 diferentes especies de protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*. Es transmitida al ser humano por la picadura de insectos de la familia Psychodidae, género *Phlebotomus* en Europa, Medio Oriente, Asia y África; y género *Lutzomyia* en América y mantenida en la naturaleza por al menos 100 especies de mamíferos que actúan como potenciales reservorios del parásito. ^(6,7)

Se estima una prevalencia de 14 millones de personas y una incidencia anual de aproximadamente dos millones de casos nuevos. Esta morbilidad representa a nivel mundial una de las más altas entre las enfermedades transmisibles. ^(3,8)

Está asociada principalmente, al sexo masculino en edad productiva, que se desenvuelve en actividades agrícolas, extracción de madera, caza, pesca y actividades de investigación en la floresta tropical, entre otros, por lo que ha sido considerada como una enfermedad ocupacional. Sin embargo, en América Latina se ha descrito un incremento del número total de casos con una distribución por grupos de edad más amplia, semejante entre hombres y mujeres. ^(6,9,10)

En nuestro país, según las estadísticas del Programa Nacional de Leishmaniasis, con sede en el Servicio Autónomo de nuestro Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, de los años comprendidos entre 1990-2016, el número de casos ha oscilado entre 2mil y 3mil casos al año con una incidencia por cada 100.000 habitantes entre 5,40-13,97. Sin embargo para el 2016 se mantenía una tasa de incidencia de 6,4; un número no despreciable. Predomina en el sexo masculino, siendo los grupos etarios más afectados entre 15-24 años, correlacionándose con la edad productiva del individuo. Prevalece en primer lugar la tipo cutánea localizada con un total de 60.310 casos, en segundo lugar la mucosa-cutánea con 659 casos, seguida de la intermedia y por último la cutáneo difusa. ⁽¹¹⁾

La LCA es causada por un grupo de especies de *Leishmania* genéticamente relacionadas entre sí. Sin embargo, ninguna de las manifestaciones clínicas es única de una especie determinada ^(12,13,14). De la eficacia de la respuesta inmunitaria del huésped, así como de la virulencia de la especie de parásito involucrado depende la forma clínica y evolución de la enfermedad. Esto conforma un amplio espectro clínico, histológico e inmunológico, con diferentes modalidades de presentación de las lesiones activas en la misma enfermedad.

Es por esta variación de presentación clínica, de una misma enfermedad, que se hace necesario incluir herramientas prácticas que le permitan al dermatólogo, además de la información clínico-epidemiológica y parasitológica, aclarar el diagnóstico de lesiones que a veces no son semiológicamente tan clásicas como las descritas en la literatura y poder acercarse a pronosticar la evolución de esta entidad. Por otra parte, las diversas formas clínicas de Leishmaniasis ofrecen una imagen histopatológica característica y han sido denominadas bajo diferentes clasificaciones, como las descritas por: Ridley, Magalhaes y Reyes Flores-Convit; sin embargo estas

clasificaciones histológicas no han sido asociadas con parámetros inmunológicos y clínico-epidemiológicos. La presente investigación plantea como herramienta práctica para optimizar la clasificación de las lesiones activas de LCA, el uso de la morformetría digital de la epidermis y dermis, que permitan cuantificar cambios morfológicos cutáneos a nivel histológico, contribuyendo a un conocimiento más profundo de la relación huésped-parásito y de los procesos inflamatorios histopatológicos que suceden en cada una de las formas activas de la LC y cómo se relacionan con parámetros clínicos, así como sus posibles implicaciones pronósticas.

Justificación e importancia

La Leishmaniasis es una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo, sobre todo en los países en desarrollo, como el nuestro; se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraerla, y cada año se producen 2 millones de casos nuevos. En los últimos 10 años se han hecho grandes avances científicos en el tratamiento, diagnóstico y prevención de la Leishmaniasis. Ello ha facilitado la aplicación de programas de control nacionales y regionales sostenibles, pese a lo cual todavía hay pocos programas de control en funcionamiento y la mortalidad y la morbilidad mundiales de la leishmaniasis presentan una preocupante tendencia en aumento.

Esta entidad presenta una gama variada de manifestaciones clínicas de las lesiones activas en piel y mucosas, la mayoría de ella de presentaciones clásicas fáciles de reconocer, pero hay un porcentaje de lesiones que escapan a estos criterios diagnósticos semiológicos y que no se comportan como lo esperado. En función de precisar el diagnóstico y una mejor clasificación de esta enfermedad, endémica en nuestro país, se propone el uso de la morfometría digital, que permitiría estandarizar a través de la evaluación de parámetros epidérmicos y dérmicos, la clasificación histopatológica, comparada con patrones descritos en la literatura y relacionarlo con variables clínico-epidemiológicas y parasitológicas del paciente, que podría ofrecer información valiosa que le permita al clínico un posible valor pronóstico en cuanto a su evolución y probable respuesta terapéutica de los pacientes en estudio.

Antecedentes

La morfometría digital es el estudio de la covariación de la forma con factores subyacentes. Su desarrollo en las últimas décadas ha alcanzado áreas de la biología tradicionalmente dedicadas al estudio descriptivo, como las ciencias morfológicas, las que con las nuevas herramientas morfométricas geométricas han logrado no sólo objetivar la evaluación cuantitativa de los cambios morfológicos sino también la evaluación cualitativa a través de la recuperación de la forma en estudio. ⁽¹⁴⁾

El análisis morfométrico consta de tres etapas fundamentales: obtención de los datos primarios, obtención de las variables de la forma, y análisis estadístico. El extenso uso que se le ha dado en los últimos años en áreas afines a las ciencias morfológicas hace necesario el conocimiento de la técnica tanto con fines formativos como para su aplicación a la solución de problemas en los que la morfología juega un rol esencial, como lo es en el caso del estudio de patologías en humanos. ⁽¹⁴⁾

En sus comienzos, la morfología se centró en la descripción de la estructura observada: tejidos, células, órganos, dimensiones, formas, relaciones entre ellos, etc. Las comparaciones entre grupos o poblaciones estaban basadas en el análisis de las diferencias de sus dimensiones lineales y la forma era considerada una cualidad de la estructura, la cual, aunque podía ser detalladamente descrita, no podía ser analizada cuantitativamente. ⁽¹⁴⁾

Con el avance de las tecnologías y la estadística, la descripción pasó a la cuantificación y adquirió términos de mayor complejidad, donde no sólo se buscaba comparar parámetros entre grupos de estudio y control, sino que además se intentó buscar relaciones entre éstos, de manera de encontrar asociaciones que permitieran explicar las diferencias observadas. ⁽¹⁴⁾

A partir de la década de 1930, estadísticos como Pearson y Fisher desarrollaron métodos de análisis, y luego los especialistas en biometría, con el objetivo de describir patrones de variación morfológicos intra e intergrupales. ⁽¹⁴⁾

Este enfoque es actualmente conocido en biometría como “morfometría tradicional” o “morfometría multivariada”. Cabe hacer notar de manera paralela, que en ciencias morfológicas así como en otras áreas que utilizan para la investigación el estudio de formas, el término “morfometría” se utiliza de manera más amplia, abarcando

estudios basados en el análisis estadístico univariado de datos lineales de estructuras macro y microscópicas. ⁽¹⁴⁾

La morfología cuantitativa es una herramienta confiable en estudios biológicos tanto clínicos como experimentales, usa un calibrador (principalmente micrométrico para medir objetos delgados en el microscopio) que permite el estudio de los cambios en la forma y tamaño de estructuras particulares en una sección del tejido teñido. La morfometría está basada en mediciones geométricas de los datos sin procesar de las imágenes en dos dimensiones ^(15,16), por lo tanto, es una representación cuantitativa de las características de las imágenes en el tiempo y espacio ⁽¹⁶⁾ y proporciona un amplio rango de opciones para analizar la morfología del tejido. Luego se implementa la segmentación, el cual es un proceso de dividir una imagen en múltiples regiones con el objetivo de identificar objetos o fronteras y se basa en la identificación de colores y aislándolos de toda la imagen. ⁽¹⁵⁾

En el campo del desarrollo de imágenes microscópicas existen varios sistemas comerciales que proveen herramientas para el procesamiento de las imágenes y realización de medidas ^(15,16). Image Pro Plus® es un programa (software) especializado en el procesamiento, mejora, y análisis de imágenes bi y tridimensionales, desarrollado por Media Cybernetics, EUA. Dentro de sus avanzadas capacidades están la fusión de imágenes, extensión a profundidad de la visión, detección de diferencias mínimas en el color de los elementos y segmentación morfológica. ⁽¹⁶⁾

Ha tenido múltiples usos en investigaciones, Fernandes Santos y col. (2013) de un corte transversal de la aorta midieron el grosor de las capas media e íntima, diámetro-perímetro-área del lumen de la aorta en un grupo de ratas con hipertensión comparadas con un grupo de ratas normotensas para analizar la hipertrofia de la pared de la misma, encontraron que en ratones hipertensos no tratados había un adelgazamiento de la íntima-media del 35%, alargamiento del diámetro luminal en 8% y aumento del área de íntima-media en un 50%. La hidralazina mejoró el diámetro del lumen y el área de la íntima media que no fue observado con olmesartán ⁽¹⁷⁾. También hicieron mediciones del diámetro del adipocito del tejido graso inguinal de ratones delgados y obesos, para evaluar hipertrofia del tejido graso

en dietas altas en grasa y sucrosa, encontrándose que los que recibieron tanto la dieta alta en grasa más los agonistas del receptor proliferador activado de peroxisoma (PPAR- γ , Rosiglitazona) producían hipertrofia del adipocito mientras que aquéllos que recibían la misma dieta más los agonista PPAR- α (Fenofibrato) y PPAR-pan (Bezafibrato) no causaban hipertrofia del adipocito. ⁽¹⁸⁾

Estos mismos investigadores hicieron estudio de ratones con enfermedad del páncreas graso no alcohólica y se evidenció aumento del diámetro de los islotes pancreáticos, la densidad de la grasa pancreática y aumento de la masa pancreática en ratones con dieta alta en grasa y sin tratamiento y aquéllos que recibieron rosiglitazona. Mientras que los ratones que recibieron la dieta alta en grasa y los fibratos no aumentó la masa pancreática. ⁽¹⁹⁾ De Melo y col. (2013) evaluaron la fertilidad de ratones salvajes, *Hylaeamys megacephalus*, midiendo la densidad y calculando el peso de los compartimientos intersticial y tubular del parénquima testicular, donde los parámetros morfométricos determinaron un aumento de la masa testicular y aumento del peso de los túbulos seminíferos, favoreciendo a la reproducción con mayor producción de esperma, característico del comportamiento sexual promiscuo de esta especie. ⁽²⁰⁾

Verçosa y col. (2012) hicieron un estudio morfométrico del infiltrado inflamatorio en piel de perros con leishmaniasis visceral y si había correlación con la carga parasitaria y las manifestaciones clínicas en perros infectados naturalmente con *Leishmania chagasi*. La morfometría se realizó usando imágenes digitalizadas en Kontron KS300 2.0 (área, perímetro y diámetros extremos del foco inflamatorio) e Image-Pro Plus 4.5 (celularidad, índice apoptótico dentro del foco inflamatorio; además de la carga parasitaria en la piel). En sus resultados evidenciaron amastigotes en perros sintomáticos y ausencia de los mismos en asintomáticos y controles, además los focos de células inflamatorias y su celularidad fueron mayores en perros sintomáticos que los asintomáticos, aunque los asintomáticos fueron mayores que los controles (perros sanos). Los neutrófilos sólo se observaron en perros sintomáticos con alta carga parasitaria. El promedio de área, perímetro y diámetros extremos del infiltrado inflamatorio fueron mayores, estadísticamente

significativo ($p < 0,05$), en perros sintomáticos que en los controles, también mostraron mayor índice apoptótico que los sujetos asintomáticos y controles. ⁽²¹⁾

Existen escasas publicaciones sobre el uso de la morfometría con Image Pro Plus® en humanos. En un estudio llevado a cabo en Grecia por Papavdi y col. (2012) estudiaron la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica, mediante la evaluación del núcleo lipídico en arterias coronarias humanas empleando el análisis morfométrico. Estudiaron el grado de estenosis del lumen y midieron la proporción de colesterol en la placa utilizando Image Pro Plus® versión 4.5. ⁽²²⁾

Mei y col. (2016) usaron este programa para hacer un mapa de la córnea en pacientes candidatos para ortoqueratología, uso de lentes de contacto permeables a gas para corregir de forma temporal la miopía. Hicieron las mediciones previas y posteriores al tratamiento proporcionando un mapa bien detallado del área corneal, deformidades, variaciones y permitió determinar el área de tratamiento. Demostrando un mapa más detallado y reproducible, con mayor confiabilidad que los mapas de topografía corneal actualmente usados. ⁽²³⁾

Grossi y col. (2016) usaron este programa para medir el colágeno en muestras tomadas a través de laparatomía de tejido graso de la línea alba de pacientes obesos con indicación de cirugía bariátrica y cadáveres no obesos; determinando una disminución significativa del colágeno tipo I y III, por lo que hay mayor riesgo en estos pacientes obesos de complicaciones como hernias. ⁽²⁴⁾

Más específicamente en dermatología se ha usado por Castro y col (2000) quienes realizan un estudio morfométrico de la placa psoriática antes y después del tratamiento tópico con Calcipotriol y un anticuerpo monoclonal ior t 1, dos veces al día por 21 días. Los resultados de este estudio mostraron una reducción marcada del grosor de la epidermis y disminución del infiltrado de linfocitos en la unión dermo-epidérmica ⁽²⁵⁾. Aydin y col. (2007), emplearon este programa en la medición del área de superficie del vitíligo, comparándose con plaquimetría computarizada, foto digital y evaluación clínica. Se observó confiabilidad estadísticamente significativa en la medición del área de vitíligo, además es un estudio relativamente sencillo, rápido y no costoso. ^(26,27)

Recientemente en nuestro Instituto, Carrera y Patiño (2016) realizaron análisis morfométrico de las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y lo relacionaron con patrones histopatológicos establecidos. Los autores evidenciaron que pacientes con patrones histológicos de Ridley (R) R-IV y R-V tenían mayor área de inflamación (AI) que aquéllos con patrón R-III ($p < 0,05$) y con patrones histológicos de Maghalaes (M) mayor AI en M-V comparado con M-III y M-IV, estadísticamente significativos. Cuando evaluaron la presencia de necrosis y el tamaño de compromiso del tejido, encontraron diferencia significativamente estadística ($p < 0,0001$) entre el patrón R-III y el patrón R-IV y entre el patrón R-IV y el patrón R-V. El análisis multivariado mostró una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre el tiempo de evolución versus el AI cuando los pacientes se clasificaron según Ridley y según la clasificación de Magalhaes se evidenció una correlación negativa estadísticamente significativa entre la leishmanina y AI. Todo esto pudo determinar más objetivamente los hallazgos histológicos de la LC y que ciertos casos viraron al polo mucocutáneo, a través de la correlación de variables: clínico, epidemiológicas, parasitológicas e histopatológicas evaluadas además con morfometría digital. ⁽²⁸⁾

Marco teórico

Historia de la Leishmaniasis

A finales del siglo XIX e independientemente unos de otros, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg y Vianna identificaron el parásito causante de la leishmaniasis, al que Ronald Ross dio el nombre genérico de *Leishmania*. En 1904, Cathoire y Laveran encontraron *Leishmania* en niños con anemia esplénica infantil. Nicolle le dio el nombre de *L. infantum*; en 1908, en Túnez, identificó el perro como su reservorio y cultivó el parásito en el laboratorio. En 1912, en Brasil, Carini identificó *Leishmania* en las lesiones mucosas de pacientes con leishmaniasis. En 1914, los rusos Yakimoff y Shakor distinguieron los parásitos causantes de la forma seca, o urbana, y húmeda, o rural, de la leishmaniasis cutánea en Asia Central. En

1922, Brahmachari describió la leishmaniasis Dérmica PostKala-Azar (PKDL) en la India. A principios de los años cuarenta, Swaminath, Shortt y Anderson, en la India, y Adler y Ber, en Palestina, demostraron la transmisión de *L. donovani* y "*L. tropica*" (probablemente *L. major*) por flebótomos (moscas de la arena). Gradualmente, se fueron esclareciendo las características clínicas y geográficas de la enfermedad humana mediante estudios de los reservorios animales y de los vectores, del comportamiento de *Leishmania* en los animales de experimentación, y de la ecología de los ciclos naturales de la leishmaniasis, reforzándose así la base taxonómica y la comprensión de la transmisión al ser humano. La clasificación genética de las especies tuvo que esperar hasta la aparición del análisis de las isoenzimas en los años setenta y de la hibridación del ADN a principios de los ochenta. ⁽²⁹⁾

Las técnicas diagnósticas originales, basadas en la identificación de amastigotes en extensiones de aspirados esplénicos y lesiones cutáneas, siguen siendo métodos de referencia. En los años noventa, la detección del ADN del cinetoplasto mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incrementó mucho la sensibilidad y permitió establecer el diagnóstico de las especies en muestras de tejidos y sangre. Las pruebas inmunodiagnósticas iniciales y la prueba del aldehído carecían de sensibilidad y especificidad, y fueron sustituidas en los años setenta por la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la inmunoadsorción enzimática (ELISA); a su vez, éstas han sido sustituidas sobre el terreno por dos técnicas que no necesitan que se disponga de un laboratorio: la aglutinación directa de los promastigotes en los años ochenta y, a mediados de los años noventa, la detección por inmunocromatografía. Más recientemente se ha introducido las técnicas de hibridación de anticuerpos monoclonales y en nitrocelulosa. ⁽²⁹⁾

Agente etiológico

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozoo dimórfico del género *Leishmania*, que pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, orden Kinetoplastida y a la familia *Trypanosomatidae* ^(12,30,31)

En la actualidad, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los flebótomos vectores: *Leishmania*, en el intestino medio o anterior, y *Viannia*, en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos. ⁽³²⁾

Morfológicamente las distintas especies de *Leishmania* no se pueden identificar. Para llegar a la clasificación de las especies del género *Leishmania* se debe considerar ciertas características: a) biológicas: morfología, tipo de desarrollo en el flebótomo vector, crecimiento en los medios de cultivo, desarrollo en el hospedador vertebrado; b) bioquímicas: electroforesis de isoenzimas, análisis del ADN del núcleo y del cinetoplasto; c) inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos no clonales y serotipificación del factor de excreción y taxonomía numérica para definir mejor la evolución molecular y la relación filogenética de los parásitos del género *Leishmania*. ⁽³²⁾

Las leishmanias se presentan bajo dos formas diferentes. El promastigote, que es móvil y flagelado, comúnmente observado en el vector invertebrado, libre, alargado, de 10 a 14 por 1,5 a 3,5 μm , se multiplica en el vector y migra a la parte anterior del mosquito y está allí hasta ser inoculado. Y la otra, amastigote, inmóvil, intracelular dentro de los macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial del huésped vertebrado, redondeado u ovoide, de 2,5 a 5,0 por 1,5 a 2,0 μm . ⁽³³⁾ En América Latina, los subgéneros de *Leishmania* y *Viannia* contienen numerosas especies de las que sólo algunas infectan al hombre. ^(34,35)

Manifestaciones clínicas y respuesta inmunológica

La lesión inicial comienza como una pápula eritematosa que progresa a un nódulo no doloroso, pruriginoso, el cual puede mejorar de forma espontánea o progresar a una de las formas clínicas de la enfermedad. ⁽³⁶⁾

- **Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)** (90-99%): Lesiones ulcerosas única o múltiples de bordes infiltrados, crecimiento en profundidad, fondo granuloso, indoloras, puede presentar lesiones satélites o adenopatías. Existen de 1 a 10

lesiones localizadas en áreas expuestas. Las manifestaciones clínicas dependen de la especie del parásito, tipo de ciclo zoonótico y respuesta del paciente, infección secundaria bacteriana frecuente, hipersensibilidad celular positiva a la reacción de Montenegro, buena respuesta al tratamiento. ⁽³⁷⁾ o puede ocurrir mejoría espontánea, dejando una cicatriz lisa hipopigmentada. ^(36,38) La LCL es la forma más prevalente y es causada por todas las especies dermatóparas de *Leishmania*. ⁽³⁸⁾

- **Leishmaniasis Cutánea Intermedia (LCI)** (1-2%): Placas o lesiones proliferativas con apariencia verrugosa o vegetante, tienden a recidivar y cronificarse con frecuencia. ⁽³⁷⁾

- **Leishmaniasis Cutánea Mucosa (LCM)** (1-2%): Las lesiones primarias son semejantes a las de la LCL. Ocurre de forma simultánea a la afectación cutánea, sin embargo, el compromiso mucoso suele ocurrir meses o años posteriores a la enfermedad cutánea. Posteriormente hay propagación metastásica a la mucosa oronasal/faríngea, la ulceración y la erosión destruyen progresivamente el tejido blando y el cartílago, las lesiones no curan espontáneamente, produciéndose mutilación notable, puede llegar a causar la muerte por complicaciones como bronconeumonía y malnutrición; presentan respuesta terapéutica: variable, poco satisfactoria, con tendencia a recaídas, cronicidad y reacción exagerada a la prueba de Leishmanina ⁽³⁷⁾. El paciente puede presentar prurito nasal, secreción, costras y epistaxis. Inicialmente se observa inflamación y eritema, para posteriormente observar úlceras y perforación del septum nasal. El paladar blando, la faringe y laringe pueden estar comprometidos. La parte anterior de la nariz se deforma por infiltración del ala nasal y la destrucción del tabique, dando el aspecto de “nariz de tapir”. El labio superior puede estar comprometido. La *L. braziliensis* es la principal especie causal, sin embargo, también participan *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* ^(12,14).

- **Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)** (< 1%): Lesiones generalmente múltiples, nodulares o de placas, infiltradas, de diferentes tamaños, color de piel eritematosa, poca tendencia a la ulceración, localizadas principalmente en áreas expuestas del cuerpo, con abundantes *Leishmanias* en las lesiones, no responde a la terapia convencional, no hay manifestaciones de inmunidad protectora, por lo que se

considera la forma anérgica de la LC; las lesiones están generalmente localizadas en cara y en superficie externa de los miembros y pueden producir mutilaciones. ⁽³⁷⁾ Las principales especies involucradas son *L. mexicana* y *L. amazonensis* ^(12,38).

Existe un tipo de leishmaniasis denominada **leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)**, considerada por diversos investigadores como otro subtipo de la enfermedad, y por otros como parte del espectro intermedio de la enfermedad. Se caracteriza por la aparición de múltiples (10 a 300) lesiones pleomórficas en dos o más áreas no contiguas del cuerpo, que ocurren por diseminación linfática o hematógena. Las lesiones pueden ser acneiformes, ulceradas, tipo pápula, y la mucosa está afectada en 29% de los casos. Se suele atribuir a *L. braziliensis*. ⁽⁹⁾

La inmunidad en la leishmaniasis depende de la forma clínica y la respuesta del huésped. Se ha descrito un espectro de fenotipos que se correlacionan con la intensidad de la respuesta inmune. La inmunidad mediada por células tiene una influencia dominante en la determinación de la enfermedad. ^(39,40)

Tanto el parásito, como el huésped intervienen en el desarrollo de la infección causada por la *Leishmania*. Las leishmanias poseen una serie de estrategias complejas para atacar, infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. El huésped falla en controlar la enfermedad debido a la habilidad que tienen algunas cepas de resistir a la acción microbicida de los macrófagos activados y a la caída de la respuesta inmunoprotectora del huésped. ⁽³¹⁾

En el humano hay fenotipos sensibles y resistentes. Las lesiones que curan espontáneamente están asociadas con una respuesta positiva de los linfocitos T antígeno específicos. En las formas visceral y cutánea difusa, se desarrolla una respuesta débil o ausente y en las formas mucocutánea existe una hiperrespuesta de los linfocitos T ^(40,42,43).

Los análisis del perfil de citocinas sugieren que el sistema inmune del huésped tiene un papel inmunorregulador en la expresión de la enfermedad. Así, en la LCL, las principales citocinas producidas son la IL-2 e IFN- γ y en la LMC y la LCD, la IL-4 e IL-10. Esto se correlaciona con los estudios en modelos murinos en los cuales la producción de IL-2 e IFN- γ (Th1), interviene en la curación de la enfermedad, mientras que las IL-4, IL-5 e IL-10 (Th2), están asociados con la progresión y

diseminación de la enfermedad. Así dos subpoblaciones de linfocitos T cooperadores en el sistema inmune murino son críticos en la inducción de la resistencia o la susceptibilidad a la infección ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

La importancia de la piel como sitio inmunorregulatorio en las tres formas clásicas de leishmaniasis y la vía de señal epidérmica es crucial en la determinación de la respuesta inmune relacionada al tipo de citocinas generado contra los parásitos de *Leishmania* ⁽³⁹⁾.

En resumen, la forma inmunocompetente está representada por la LCL, lo cual se demuestra al tener una leishmanina positiva. El granuloma presenta un patrón de citocinas predominantemente Th1. La presencia del parásito induce la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Las células dendríticas (CDs) son estimuladoras de linfocitos T leishmania específicos, inducen una efectiva respuesta Th1 frente al parásito. En el otro extremo inmunológico, encontramos que en la LCD existe una deficiencia en citocinas que afecta a las células presentadoras de antígenos e inducen una anergia parásito-específica. El granuloma se caracteriza por una respuesta predominantemente Th2, con la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. La prueba de leishmanina es negativa. En la LCM existe un patrón mixto de citocinas Th1 y Th2, con buenos niveles de IFN- γ , TNF- α e IL-2. La forma de presentación clínica ocurre por una sobreactivación de la respuesta inmunitaria, al tener bajas concentraciones de IL-10, existiendo una respuesta inmunológica crónica que contribuye al daño tisular, con una reacción de leishmanina fuertemente positiva. La curación depende de la relación entre las citocinas producidas. ^(12,43-50)

Clasificación histopatológica por patrones

Reyes Flores en conjunto con **Convit**, estudiaron el sitio ideal para la toma de biopsia en pacientes provenientes de toda Venezuela que acudían a la consulta de Dermatología del Instituto de Biomedicina y los clasificaban dependiendo de los hallazgos histopatológicos de las lesiones activas en piel en tres grandes grupos: LCL, LCI, LCD. Sugerían que el sitio de la toma de la biopsia fuese de acuerdo al tipo de lesión a estudiar. En las lesiones nodulares y en placas, el material debe ser tomado de la zona más infiltrada, evitando los sitios erosionados, ulcerados o

costrosos. En las úlceras el mejor sitio es el borde de la lesión, procurando interesar la zona infiltrada y parte de la úlcera propiamente dicha. En las lesiones mucosas también deben seleccionarse áreas infiltradas, preferiblemente no costrosas ni ulceradas, debiendo emplear un instrumental adecuado, por lo habitualmente difícil del abordaje de las zonas lesionadas y el frecuente sangramiento. ^(12,36)

- **LCL**: Existen cambios epiteliales variables. En los nódulos y placas la epidermis puede estar aplanada perdiéndose la línea ondulada del límite dermo-epidérmico ocasionado por la normal distribución alternada de conos interpapilares y papilas dérmicas. El grosor de la epidermis habitualmente disminuye y puede estar francamente atrófica. En las úlceras, la epidermis se pierde abrupta o suavemente en la zona ulcerada, quedando el resto habitualmente acantótica, de grado variable y con cierta frecuencia se observa un epitelio con hiperplasia pseudo-carcinomatosa. La dermis está ocupada por un infiltrado macrofágico con grado variable de diferenciación epitelioide, difuso o focal, ocupando áreas de variable extensión en todo el espesor de la dermis. El grado de diferenciación estará modulado por mecanismos inmunológicos y por la especie de *Leishmania* causal. Una cantidad variable de células linfoides y células plasmáticas rodean o invaden el infiltrado macrofágico. Frecuentemente se observa escaso a moderado número de células gigantes de tipo Langhans. No es infrecuente observar cantidad variable de PMNs aislados o agrupados tendiendo a formar microabscesos o situados en zonas necrobióticas donde se observan fragmentos (polvo nuclear). Eventualmente puede apreciarse escaso número de eosinófilos. Los amastigotes deben ser buscados principalmente intracelulares, intramacrofágicos y las zonas recomendadas para su hallazgo son el límite entre el borde de la lesión y la úlcera, alrededor o en las zonas donde se observa polvo nuclear y en los espacios dérmicos circunscritos por las áreas hiperplásicas y anastomosante de la epidermis. ^(12,36)

- **LCD**: La epidermis está habitualmente atrófica, con rectificación del límite dermo-epidérmico. La dermis intensa y ampliamente ocupada por un infiltrado macrofágico denso, muy vacuolado, con escasa o moderada cantidad de células linfoides y plasmáticas en los intersticios conjuntivos situados entre las células

vacuoladas. La infiltración puede rechazar en tal forma a la epidermis, que puede erosionarla. La inflamación puede invadir la grasa subcutánea. Se observan numerosos amastigotes, la mayoría dentro del interior de los macrófagos vacuolados donde se organizan formando una hilera o collar adherido a la cara interna de la membrana celular o bien se disponen irregularmente asilados o en pequeños grupos en el seno de la célula. Observaron lesiones donde las células vacuoladas predominaban hacia la dermis superior y dermis media y los macrófagos, con grado variable de diferenciación epitelioides, predominan hacia la dermis profunda. El número de parásitos disminuía de la superficie a la profundidad donde eran escasos o inexistentes. A esta forma la denominaron "bordeline". (12,36)

- **LCM:** Se observa un infiltrado mixto linfohistioplasmocitario, generalmente difuso o en focos mal definidos. Habitualmente el infiltrado macrofágico muestra discreto a moderado grado de diferenciación epitelioides. Los amastigotes están presentes en escaso número no pueden ser identificados. (12,36)

De igual forma Reyes y Convit establecieron que un número no despreciable de muestras de pacientes con diagnóstico de LC, no encajaban dentro de las características histopatológicas previamente mencionadas, por lo que podrían ser clasificadas en un grupo inespecífico que denominaron **Granuloma a Agente Vivo (GAV)**, caracterizándose por ser una dermatitis nodular neutrofílica/linfocítica con infiltrado perivascular superficial de grados variables, sin evidencia de agente vivo. (12,36)

En el año 1980, **Ridley y col.** realizaron una clasificación histológica de la LMC aún utilizada. Tomaron biopsias de lesiones en piel y mucosa en 60 pacientes brasileros con LC o LCM no tratada, evaluando la posterior respuesta al tratamiento en 38 pacientes. Lograron detectar una relación entre ciertos parámetros histológicos y los resultados clínicos, tiempo de evolución, y respuesta al tratamiento. Los patrones observados fueron agrupados de acuerdo a la intensidad de las características histológicas dérmicas, enumerados en el orden creciente de la intensidad de la respuesta (I a V), sin corresponder al orden de severidad clínica: (50)

- **Grupo I (R-I)**: Dermis de aspecto normal excepto por parches de degeneración de colágeno. De forma ocasional existe una pequeña área de necrosis fibrilar, con muy escasos fibroblastos. Escasa presencia de células inflamatorias, ausencia de granuloma y sin compromiso de la epidermis. ⁽⁵⁰⁾

- **Grupo II (R-II)**: La característica predominante es un proceso necrótico más severo en la dermis con mayor respuesta reactiva. Se puede observar necrosis fibrinoide severa con vasculitis aguda en dermis superficial. En la mayoría de los casos existen pequeños focos dispersos con cambios fibrinoides y edema, con proliferación de fibroblastos. No presenta una gran acumulación de células inflamatorias. ⁽⁵⁰⁾

- **Grupo III (R-III)**: La dermis tiene un intenso infiltrado de células plasmáticas (predominantemente), linfocitos y macrófagos aislados, sin granuloma. PMNs están usualmente presentes, y se pueden encontrar escasas células gigantes de tipo cuerpo extraño. Presenta vasculitis de capilares o formación de trombo de fibrina en la dermis superior. No se observa necrosis focal. ⁽⁵⁰⁾

- **Grupo IV (R-IV)**: Abundantes linfocitos y células plasmáticas (pero no de forma predominante). Escasas células gigantes tipo Langhans o pequeños focos de células epitelioides. Puede haber necrosis en la parte central del granuloma. ⁽⁵⁰⁾

- **Grupo V (R-V)**: Presencia de granuloma con células epitelioides bien formadas, con o sin células gigantes tipo Langhans bien diferenciadas. Puede presentar abundancia de células plasmáticas, con pocos linfocitos. No hay necrosis, y la fibrosis es acentuada. ⁽⁵⁰⁾

En el estudio de Ridley los grupos tenían una significancia pronóstica. Los pacientes pertenecientes a los grupos II y IV tenían únicamente afectación cutánea, con respuesta favorable al tratamiento o curaron de forma espontánea y no presentaron recaída. Los grupos I y V fueron predominantemente pacientes con LCM y todos presentaron una inadecuada respuesta terapéutica. El grupo III tenía a pacientes con LCL que progresaron a LCM, y pacientes LCM, con respuesta variable al tratamiento. La característica histológica que demostró tener un valor pronóstico fue la presencia de necrosis con respuesta reactiva. Los investigadores no observaron relación con la

presencia de anticuerpos séricos contra el parásito, leishmanina (usualmente positiva), o con la carga parasitaria (siempre baja).⁽⁵⁰⁾

En 1986, **Magalhaes y col.** describieron patrones histopatológicos de la LC causada por *L. (Viannia) braziliensis*, la especie del parásito más abundante en Brasil y en Venezuela. Analizaron las lesiones de 378 pacientes con LCL y LCM procedentes de una localidad endémica de Brasil. Observaron pocos amastigotes, en 63,7% de los casos de forma cutánea y en 37,5% de los casos mucocutáneos⁽⁵¹⁾. Las alteraciones epidérmicas descritas por Magalhaes no mostraron significancia. Las lesiones cutáneas ulceradas, que representaban la mayoría de los casos, mostraron grado variable de espesor epidérmico, constituido por hiperplasia pseudocarcinomatosa a diversos niveles. En las formas mucosas presentaron modestas modificaciones en la epidermis. Como estas alteraciones son inespecíficas y no relacionadas al infiltrado, no fueron consideradas para establecer los patrones histológicos de la enfermedad. Clasificaron las lesiones en 5 grupos de acuerdo a los resultados presentes en dermis⁽⁵¹⁾:

- **Grupo I (M-I):** Reacción exudativa celular. Con la presencia de un infiltrado proporcional de histiocitos, linfocitos, y células plasmáticas.⁽⁵¹⁾
- **Grupo II (M-II):** Reacción exudativa necrótica. Caracterizada por la presencia de necrosis en la dermis, de amplitud variable, esférica u ovalada, e infiltrado histiolinfoplasmocitario, que puede presentar polvo nuclear y eosinófilos.⁽⁵¹⁾
- **Grupo III (M-III):** Reacción exudativa y necrótica-granulomatosa. Correspondiente a reacción granulomatosa desorganizada alrededor o en la proximidad de las áreas de necrosis, caracterizado por la presencia de macrófagos o células gigantes. Presencia de infiltrado histiolinfoplasmocitario.⁽⁵¹⁾
- **Grupo IV (M-IV):** Reacción exudativa granulomatosa. Caracterizada por la formación de un granuloma desorganizado, sin necrosis tisular y presencia de infiltrado histiolinfoplasmocitario⁽⁵¹⁾.
- **Grupo V (M-IV):** Reacción exudativa tuberculoide. Caracterizada por la formación del típico granuloma tuberculoide constituido por macrófagos, células

epitelioides y gigantes, dispuestos de forma bien delimitada, rodeado por infiltrado histiolinfoplasmocitario. ⁽⁵¹⁾

Magalhaes y col. concluyeron que la reacción exudativacelular representa el primer y último patrón de la lesión de LCL y LCM. Los otros cuatro patrones histopatológicos caracterizan a las formas intermedias observadas en la evolución de la enfermedad ⁽⁵¹⁾.

Métodos diagnósticos.

Es imperativa la evaluación de los antecedentes epidemiológicos y las manifestaciones clínicas del paciente. El diagnóstico definitivo se fundamenta en la demostración del parásito en material obtenido de lesiones sospechosas, para lo cual se utilizan diferentes métodos:

- **Leishmanina:** Es una reacción de hipersensibilidad tardía que consiste en la aplicación intradérmica de antígenos inactivados por autoclave obtenidos de una suspensión de promastigotes de *Leishmania mexicana pifanoi* (cepa LEM-279) en una concentración de 6.25×10^6 producida en el laboratorio de Bioquímica-Producción de Vacunas ubicado en el Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”; el producto obtenido es mantenido bajo 4 a 8 grados centígrados desde el momento de su producción hasta su uso. La aplicación de la prueba consiste en tomar 0,1ml de la solución correspondiente con una inyectora de tuberculina de aguja 25G y por vía intradérmica se aplica en antebrazo superior izquierdo garantizando la formación de una pápula pálida. La lectura de la prueba se realizará a las 72 horas desde el momento de su aplicación y se interpretara de la siguiente manera de acuerdo a la induración desarrollada como: negativa <5 mm, presencia de respuesta de inmunidad celular ≥ 5 mm, positiva entre 10-20 mm e hiperreactor entre 21-30 mm ^(10,39)

- **Tinción del parásito:** Consiste en la visualización del parásito de muestras obtenidas de pacientes, bien sea de material de biopsia en frotis por aposición o por escarificado (FPE) de la misma. Estas muestras se colorean con Giemsa y los amastigotes de *Leishmania* son observados en el interior de los

macrófagos o fuera de éstos. El parásito también puede observarse en cortes histológicos, encontrándose más fácilmente en las formas difusas. La sensibilidad de estos métodos ha sido reportada entre 32.7 a 90.4%. ^(10,39)

- **Histopatología:** Presenta una sensibilidad limitada para observar *Leishmania* debido a los cambios que sufre la misma durante el proceso de fijación de las muestras con formol; sin embargo, la característica formación de un granuloma ante una lesión sospechosa orienta altamente al diagnóstico. ⁽⁵³⁾ Diversos cambios epidérmicos puede observarse en las lesiones cutáneas de Leishmaniasis activa: hiper y paraqueratosis, escamo-costras, ulceraciones de fondo variablemente necrótico y purulento, acantosis e hiperplasia pseudocarcinomatosa, atrofia y erosiones, exocitosis por células mono y polinucleares. En dermis puede observarse un infiltrado predominantemente macrófagico, invadido y rodeado de manera variable por células linfoides y plasmáticas, células multinucleadas gigantes, de tipo Langhans y eventualmente de tipo cuerpo extraño. También puede estar presente cantidad variable de PMNs y eventualmente escasos eosinófilos, áreas o focos de necrosis de variable extensión con o sin PMNs íntegros o fragmentados (polvo nuclear). Las diversas formas clínicas ofrecen una imagen histopatológica más o menos característica. Se clasifica por diversos patrones como: el de Reyes Flores-Convit, Ridley y Magalhaes, mencionados anteriormente en el apartado de “Clasificación histopatológica por patrones” ^(12,36,50,51).

- **Cultivo:** Se realiza cuando se requiere aislar el parásito para establecer su clasificación taxonómica, sensibilidad a medicamentos, estudios epidemiológicos y para diagnóstico. La sensibilidad de este método ha sido reportada entre 52.4 a 70%. ^(10,39)

- **PCR:** Se basa en la complementariedad de las dos hebras del ADN. El ADN del parásito se puede detectar mediante la amplificación de un fragmento de la secuencia utilizando iniciadores de la reacción de polimerización de la segunda cadena. Estos iniciadores son elaborados en laboratorio partiendo de secuencias conocidas y se unen a la hebra molde en caso de ser complementarios del parásito utilizando iniciadores. La sensibilidad de esta técnica ha sido reportada hasta de 98% ya que puede ser positiva ante la presencia de escaso número de parásitos. ⁽³⁹⁾

○ **Técnicas serológicas:** La inmunofluorescencia indirecta y el ELISA son dos técnicas muy utilizadas, que nos miden el nivel de anticuerpos en sangre contra el parásito, con buena sensibilidad y especificidad. ⁽³⁹⁾

Objetivo General

Realizar una caracterización morfométrica de las lesiones de piel de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA) en sus variantes: localizada (LCL), cutánea intermedia (LCI), cutánea-mucosa (LCM) y cutánea difusa (LCD) y relacionarlo con los patrones histopatológicos de Ridley, Magalhaes y Reyes Flores-Convit y las características clínico epidemiológicas.

Objetivos Específicos

1. Describir las características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de los pacientes con diagnóstico de: LCL, LCI, LCM y LCD.
2. Determinar los patrones histológicos de Ridley, Magalhaes y Reyes Flores-Convit en las formas activas de LCA de los pacientes a estudiar.
3. Cuantificar: el grosor de la epidermis (E), número de granulomas (G) y área de infiltrado promedio de los granulomas (AI) en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (HE) de los pacientes con LCA.
4. Comparar los parámetros morfométricos con las características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de los pacientes con LCA.

Hipótesis

La evaluación morfométrica digital de las lesiones permitirá la caracterización del proceso inflamatorio del espectro de LCA y generará índices de importancia para el diagnóstico, el seguimiento de las lesiones y posible valor pronóstico.

Aspectos éticos

Este estudio fue establecido bajo los cuatro principios bioéticos fundamentales como lo son: autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia, se realizó en base a lo establecido por la declaración de Helsinki (2008), promulgada por la Asociación Médica Mundial y el Código de Deontología Médica de la Federación Médica de Venezuela. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit”. Para el uso de historias médicas y biopsias de piel tomadas durante el período comprendido entre enero 1990 y enero de 2018. Los autores se comprometieron verbal y por escrito (ver anexo 1) a la no divulgación de la información y datos que se obtengan de la presente investigación.

MÉTODOS

Tipo de estudio

Retrospectivo, observacional, descriptivo, analítico, de corte transversal.

El estudio que se realizó es de tipo descriptivo ya que se recolectó la información relacionada con el estado real del fenómeno a investigar, tal como se presentó al momento de su recolección y posteriormente se presentaron los datos en resultados y conclusiones. Este proceso descriptivo no solo se limitó al uso de un instrumento de recolección de datos tipo ficha, sino que se interpretó el significado e importancia de lo descrito, estableciendo a posteriori las pautas para llegar a conclusiones significativas, las cuales se basaron en comparaciones, contraste o relación de variables.

En lo que respecta a la inferencia del investigador en el fenómeno que se analizó, fue observacional, puesto que sólo se midieron las variables en estudio, sin modificar ninguno de los factores que intervinieron en su génesis.

Si se toma en cuenta el período en el cual se recolectó la información, se habla de un estudio retrospectivo, por cuanto toda la información fue recogida de acuerdo a los criterios establecidos para fines específicos de la investigación antes de ser planificada.

Población y muestra

La población estaba conformada por las historias médicas y biopsias de piel de pacientes con diagnóstico clínico, parasitológico e histopatológico de LCA que acudieron a la consulta de Leishmaniasis de la sección de Dermatología Clínica del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, durante el período comprendido entre enero 1990 y enero de 2018, que cumplieron con los criterios de inclusión preestablecidos para esta investigación. La muestra fue de tipo intencional y no probabilística; estuvo conformada por el número de casos admitidos en el período ya mencionado que cumpliera con los criterios de inclusión planteados por los autores.

Criterios de inclusión

- A.** Historias médicas de pacientes de ambos sexos.
- B.** Historias médicas de pacientes con diagnóstico: clínico, parasitológico e histopatológico de LCA.
- C.** Historias médicas de pacientes evaluados en la consulta de Leishmaniasis de la sección de Dermatología Clínica del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit entre enero de 1990 y enero de 2018.

Criterios de exclusión

- A.** Historias médicas de pacientes con ausencia de diagnóstico parasitológico o histopatológico de LCA.
- B.** Historias médicas de pacientes que hubieran sido evaluados por una consulta distinta a la de Leishmaniasis de la sección de Dermatología Clínica del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit entre enero de 1990 y enero de 2018.
- C.** Historias médicas de pacientes que hubieran recibido tratamiento previa a la toma de biopsia de piel.
- D.** Historias médicas de pacientes embarazadas.
- E.** Historias médicas con información de variables incompletas.

Variables. Operacionalización de las variables (ver anexo 2, tabla 1 y 2)

1. Variables demográficas y diagnósticas

- Edad: Años de vida de los pacientes. Variable cuantitativa, ordinal e independiente.
- Sexo: Género del paciente. Variable cualitativa, nominal e independiente.
- Procedencia: Lugar de residencia de los pacientes. Variable cualitativa, nominal e independiente.
- Tipo de lesión: Descripción semiológica de la lesión activa de LC. Variable cualitativa, nominal y dependiente.

- Localización de las lesiones: Ubicación anatómica de la lesión activa de LC. Variable cualitativa, nominal y dependiente.
- Número de lesiones: Cantidad de úlceras de LCL. Variable cuantitativa, ordinal e independiente.
- Tamaño de lesiones: Diámetro medido en mm de la lesión activa más grande. Variable cuantitativa, ordinal, dependiente.
- Leishmanina: Intradermorreacción de Montenegro utilizada para el diagnóstico inmunológico de la LC. Variable cuantitativa, ordinal y dependiente.
- Frotis por escarificado (FPE): Método diagnóstico parasitológico. Variable dependiente, cuantitativa y ordinal.
- Patrón de Reyes Flores-Convit: Clasificación histológica de la LC. Variable cuantitativa, discreta y ordinal.
- Patrón de Ridley: Clasificación histológica de la LC. Variable cuantitativa, discreta y ordinal.
- Patrón de Magalhaes: Clasificación histológica de la LC. Variable cuantitativa, discreta y ordinal.
- PCR de Leishmania: Presencia del parásito en las biopsias y establecimiento de la especie. Variable cualitativa, nominal y comparativa.

2. Variables morfométricas:

- Epidermis: Grosor de la capa superficial de la piel. Variable dependiente, cuantitativa, continua y ordinal. Se denominará "E".
- Infiltrado inflamatorio: Cantidad de células nucleadas presentes en la dermis. Variable dependiente, cuantitativa, continua y ordinal. A la medición del área de infiltrado se le denominará "AI".
- Número de granulomas: Cantidad de áreas de infiltrados presentes en la dermis. Variable dependiente, cuantitativa, continua y ordinal.

Procedimientos

- Selección de la muestra: A través de la recolección de todas las láminas histopatológicas de la Sección de dermatopatología de pacientes con diagnóstico de

Leishmaniasis Cutánea que acudieron a la consulta de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit (entre enero 1990 y enero de 2018), en sus variantes cutánea localizada, mucocutánea, intermedia y difusa. Paralelamente se ubicó la historia clínica del paciente con la información clínico-epidemiológica y parasitológica correspondiente a la lámina histopatológica a analizar.

- Caracterización histológica: Dichas láminas fueron evaluadas y clasificadas por un dermatopatólogo quién clasificó las muestras ciegamente según los patrones propuestos por: Ridley, Magalhaes y Reyes Flores-Convit, sin conocer información clínica relacionada a los pacientes.

- Análisis morfométrico: Se utilizó un microscopio LeitzDiaplan con una cámara Leica DFC420 y Leica Application Suite Software para capturar imágenes de las diapositivas con una ampliación objetiva de 10X y de 40X. Se exportó la imagen al analizador Image Pro Plus® versión 5.0.

El grosor de la epidermis (E) se midió trazando una línea longitudinal en el diámetro mayor y líneas perpendiculares hasta cada una de las crestas epidérmicas en 10X (ver imagen 1A)

El área de infiltrado (AI) o área de infiltrado granulomatoso se midió a 10X, utilizando la herramienta poligonal para medir área (ver imagen 1B)

El número de granulomas (G) se contabilizaron a 10X en la dermis (ver imagen 1B)

Posteriormente, se analizó la información histopatológica obtenida en conjunto con los datos clínicos-epidemiológicos y parasitológicos de la historia médica de dicho paciente, para su posterior relación al momento de evaluar los resultados.

Tratamiento estadístico

Los resultados de las mediciones morfométricas fueron expresadas en la media +/- desviación estándar. Las diferencias entre las variables morfométricas y clínico epidemiológicas evaluadas se analizaron empleando test no paramétrico con análisis de varianza de Kruskal-Wallis y el de Mann-Whitney; para las variables evaluadas en porcentaje se realizaron tablas de contingencia empleando el método de Fisher

Las correlaciones entre las variables evaluadas se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Una $p < 0,05$ fue considerada como estadísticamente significativa para todos los casos.

Todos los test para estos análisis estadísticos fueron provistos por el programa GraphPad INSTAT- 3 versión de software 3.02 (GraphPad Software, San Diego, EEUU, [http:// www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

RESULTADOS

Generalidades

La población en estudio consistió en 54 pacientes, en edades comprendidas entre 2 y 67 años (\bar{X} = 33,35 años). Predominó el sexo masculino en el 62,96% de los pacientes. Provenientes de: Miranda (28), Guárico (4), Vargas (4), Aragua (3), Lara (3), Portuguesa (3), Apure (2), Amazonas (1), Anzoátegui (1), Bolívar (1), Distrito Capital (1), Táchira (1), Trujillo (1), Zulia (1).

De estos 53 pacientes, 28 fueron diagnosticados con LCL (53,70%), 14 con LCD (24,07%), 7 con LMC (12,96%) y 5 con LCI (9,27%).

Características clínico-epidemiológicas y parasitológicas

LCL

De un total de 28 pacientes, 14 eran masculinos y 14 femeninos, 50% respectivamente, en edades comprendidas entre los 6 y 67 años (\bar{X} = 36,06 años), provenientes en su mayoría de Miranda (72,41%). Clínicamente las lesiones que predominaron fueron las úlceras presentes en el 96,55% de los pacientes. El promedio del tiempo de evolución de las lesiones antes de su consulta fue de 3,65 meses y estuvieron localizadas en su mayoría en extremidades. En promedio el número de lesiones que presentaban los pacientes fue de 1,7 con un tamaño promedio de 27,83mm. La leishmanina fue positiva en 27 casos y negativa en 1 con tamaño promedio de 15,31mm, mientras que el frotis por escarificado fue positivo en 20 de los 28 casos (68,97%). Se realizó en todas las muestras PCR siendo compatibles con *L. braziliensis* (ver tabla 3).

LCI

De un total de 5 pacientes, predominó el sexo masculino (60%), en edades comprendidas entre los 17 y 60 años (\bar{X} = 39,6 años), provenientes en su mayoría de Miranda (80%) y Distrito Capital (20%). Clínicamente las lesiones que predominaron fueron las úlceras en todos los pacientes. El promedio del tiempo de evolución de las lesiones antes de su consulta fue de 4,4 meses y estuvieron localizadas en: extremidades (en todos los pacientes), cara y extremidades en 2 pacientes. En

promedio el número de lesiones que presentaban los pacientes fue de 3 con un tamaño promedio de 109mm. La leishmanina fue positiva en 4 de los 5 pacientes ($\bar{X} = 13,6\text{mm}$), mientras que el frotis por escarificado fue positivo en todos los casos. Se realizó PCR en todas las muestras siendo todas compatibles con *L. mexicana* (ver tabla 4).

LCM

De un total de 7 pacientes, predominó el sexo masculino (85,74%), en edades comprendidas entre los 31 y 62 años ($\bar{X} = 50$ años), provenientes en su mayoría de Portuguesa (42,88%), Bolívar (14,28%), Zulia (14,28%), Trujillo (14,28%) y Miranda (14,28%). Clínicamente las lesiones que predominaron fueron las úlceras en 5 de los 7 pacientes (71,42%), seguida de placas y pápulas. El promedio del tiempo de evolución de las lesiones antes de su consulta fue de 99,28 meses (8,25años) y estuvieron localizadas en todos los pacientes a nivel de mucosa nasal y en un caso en paladar blando. En promedio el número de lesiones que presentaban los pacientes fue de 1,42 con un tamaño promedio de 10,57mm. La leishmanina fue positiva en todos los pacientes ($\bar{X} = 20,71\text{mm}$), mientras que el frotis por escarificado fue positivo solo en 3 de los 7 pacientes. Se realizó PCR en todas las muestras siendo todas compatibles con *L. mexicana* (ver tabla 5).

LCD

De un total de 14 pacientes, predominó el sexo masculino (76,92%), en edades comprendidas entre los 2 y 40 años ($\bar{X} = 17,07$ años), provenientes en su mayoría de Guárico (30,76%) y Lara (23,07%). Clínicamente las lesiones que predominaron fueron: nódulos y placas en 8 y 7 pacientes respectivamente, seguida de pápulas en 6 y úlceras solo en 3 de los 13 pacientes. El promedio del tiempo de evolución de las lesiones antes de su consulta fue de 200,64 meses (estimado de 16 años) y estuvieron localizadas en: cara y extremidades en 12 de los 13 casos y en tronco en 10 pacientes. En promedio el número de lesiones que presentaban los pacientes fue de 25,125 con un tamaño promedio de 14mm. La leishmanina fue negativa en un 84,62% de los pacientes, mientras que el frotis por escarificado fue positivo en los 13 pacientes. Se realizó PCR en todas las muestras siendo compatible con *L. mexicana* en 12 de los 13 pacientes y un solo caso que reportó *L. venezuelensis* (ver tabla 6).

Especies de *Leishmania* y su distribución geográfica

La LCL estuvo asociada a la infección por *L. braziliensis* la cual se distribuyó en el 71.44% en el Estado Miranda. Por otro lado el resto del espectro estuvo causado por *L. mexicana* a excepción de un caso de LCD por *L. venezuelensis* reportada en el Edo. Miranda, específicamente en una paciente proveniente de la población de Río Chico. La *L. mexicana* estuvo distribuida principalmente en el Edo. Miranda para LCD y LCI (35,71% y 80% respectivamente) y en Portuguesa para LCM (42,85%) (ver tabla 7)

Patrones histopatológicos de Ridley, Magalhaes y Reyes-Convit

Distribución de los pacientes con base a la clasificación histológica de Ridley

En LCL el 82.7% de los pacientes tenían el patrón R-IV, 10.3% el patrón R-V y 3.4% tanto el patrón R-II y R-III. En LCD 92.7% tenían patrón R-IV y 7.3% patrón R-II. En LCI 80% tenían patrón R-IV y un 20% patrón R-V. En LCM 42.8% presentaron patrón R-IV, 28.6% patrón R-I y 14.2% tanto en patrón R-III y R-V.

Predominó en toda la muestra el patrón R-IV, sin embargo es importante destacar un porcentaje no despreciable de lesiones clasificadas como R-I (ver tabla 8, gráfico 1A).

Distribución de los pacientes con base a la clasificación histológica de Magalhaes

En LCL el 44.8% de los pacientes tenían el patrón M-III, 37.9% el patrón M-IV y 17.2% patrón M-V. En LCD 84.6% tenían patrón M-IV y 7.7% tanto patrón M-II y M-III. En LCI 80% tenían patrón M-IV y un 20% patrón M-V. En LCM 42.8% presentaron patrón M-IV, 28.6% patrón M-I y 14.2 tanto en patrón M-III y M-V.

Predominó en toda la muestra el patrón M-IV, sin embargo el mayor porcentaje de lesiones LCL fueron clasificadas como M-III (ver tabla 8, gráfico 1B).

Distribución de los pacientes con base a la clasificación histológica de Reyes-Convit

En LCL el 65.4% de los pacientes tenían el patrón GAV, 24.1% patrón LCL y 10.3% tanto el patrón LCD. En LCD 76.9% tenían patrón LCL, 15.3% patrón LCD y 7.8%

patrón GAV. En LCI 60% tenían patrón LCL y 40% patrón GAV. En LCM 100% presentaron patrón GAV.

Predominó en toda la muestra el patrón RC-GAV, específicamente para las lesiones LCL y LCM, sin embargo la mayoría de las lesiones LCI y LCD fueron clasificadas en el patrón RC-LCL (ver tabla 8, gráfico 1C).

Evaluación morfométrica de las lesiones de pacientes con LCA

-Grosor de la Epidermis (E)

El grosor de la epidermis (E) según las formas clínicas de LCA arrojó: LCL 18 ± 2 mm, LCD 10 ± 1 mm, LCI 22 ± 9 mm, LCM 32 ± 8 mm (ver gráfica 2A). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0158$) por el análisis de varianza de Kruskal-Wallis entre E y las formas clínicas. La E en LCL es más delgada que en LCM ($p=0,0433$) y el adelgazamiento de la epidermis LCD fue mayor que en LCL ($p=0,0297$) (U Mann Whitney).

-Área de infiltrado (AI)

El área de infiltrado (AI) según las formas clínicas: LCL 314 ± 116 mm², LCD 2028 ± 225 , LCI 1600 ± 564 , LCM 2079 ± 558 (ver gráfica 2B). El AI en LCL es la más pequeña en comparación con: LCD ($p<0,0001$), LCI ($p<0,0021$) y LCM ($p>0,0001$) (U Mann Whitney).

-Número de granulomas (G)

El número de granulomas (G) de acuerdo a las formas clínicas arrojó: LCL 4 ± 1 , LCD 4 ± 1 , LCI 7 ± 2 y LCM 2 ± 1 (ver gráfica 2C). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p< 0,0256$) por el análisis de varianza de Kruskal-Wallis. El G en LCI es mayor que en LCM ($p< 0,0101$) y LCD ($p< 0,0567$). Además el G de LCM es menor a LCD ($p< 0,0300$) (U Mann Whitney).

Evaluación morfométrica de las lesiones de pacientes con LCA y su relación con las características clínico-epidemiológicas y parasitológicas

-Grosor de Epidermis (E), leishmanina y tamaño de la lesión

Como se aprecia en la gráfica 3A, los pacientes con LCM tienen mayor E que se relaciona con el menor tamaño de las lesiones y valores más altos de leishmanina.

Mientras que los pacientes con LCL tienen menor E y leishmanina pero con mayor tamaño de las lesiones.

-Área de infiltrado (AI), leishmanina y tamaño de la lesión

Los pacientes con LCI presentan el menor AI de todo el espectro, mientras que en LCM hay mayor AI, con el menor tamaño de la lesión y con el mayor valor de leishmanina, comparándose con LCL donde se encontró menor AI, a pesar de tener mayor tamaño de las lesiones y una leishmanina relativamente más baja (ver gráfica 3B).

-Número de granulomas (G), leishmanina y tamaño de la lesión

En la gráfica 3C se puede observar que los pacientes con LCI presentan el mayor número de granulomas con el valor más bajo de leishmanina y un valor alto del número de lesiones. Mientras LCM presenta el menor número de granulomas, la leishmanina más elevada y el tamaño de la lesión más bajo.

-Correlaciones entre variables morfométricas y clínicas.

Se demostró una correlación positiva entre la E y la leishmanina en los pacientes con LCA (Spearman $r= 0,400$, $p<0,001$), es decir, que existe una relación directamente proporcional entre las variables antes mencionadas.

La correlación de Spearman mostró una asociación negativa entre el AI y el tamaño de la lesión en los pacientes con LCA (Spearman $r= -0,300$, $p<0,01$), es decir, que existe una relación indirectamente proporcional entre las variables antes mencionadas.

No se encontró correlación entre el número de granulomas, la leishmanina y el tamaño de la lesión.

Evaluación morfométrica de las lesiones de pacientes con LCA según las especies de *Leishmania*

-Diferenciación de granulomas y especie

No se evidencia mayor diferencia entre el grado de diferenciación de los granulomas en cuanto a especie, sin embargo en ambos predomina el granuloma diferenciado (ver tabla 9 y gráfica 4A).

-Grosor de la epidermis (E) y especie

Las lesiones secundarias a infección por *L. mexicana* presentaron mayor E con respecto a *L. braziliensis* como se puede observar en la tabla 9 y el gráfico 4B ($p < 0,0001$).

-Área de Infiltrado y especie

En la tabla 9 y el gráfico 4C se observa que el AI es mucho mayor para las lesiones producidas por *L. mexicana* ($1882\text{mm}^2 \pm 212$) en comparación con *L. braziliensis* ($341\text{mm}^2 \pm 117$) ($p < 0,0001$).

-Número de granulomas y especie

La *L. mexicana* produjo mayor número de granulomas con respecto a *L. braziliensis* (ver tabla 9 y gráfica 4D), sin embargo no fue estadísticamente significativo.

Evaluación morfométrica de las formas activas de LCA según el granuloma

-Grado de diferenciación del granuloma

En la tabla 10 y el gráfico 5A se pudo observar que en las lesiones activas de LCL, LCD y LCI predominó el granuloma diferenciado en contraposición de lo que se observó en LCM donde predominan los granulomas no diferenciados con una $p < 0,001$ en comparación con el resto del espectro.

-Grosor de la epidermis y número de granulomas

La LCM presentó el menor número de granulomas pero el mayor E (2 ± 1 y $32\text{mm} \pm 8$ respectivamente) como se observa en la tabla 10 y en la gráfica 5B.

-Área de infiltrado y número de granulomas

Como se observa en la tabla 10 y gráfico 5C LCM presenta la mayor AI con el menor número de granulomas.

-Grosor de epidermis y grado de diferenciación del granuloma

Los pacientes con LCM tienen predominio de granulomas no diferenciados y el mayor E, mientras que en LCI y LCD predominaron los granulomas diferenciados, pero en esta última E fue la menor (ver tabla 10 y gráfico 5D)

-Área de infiltrado y grado de diferenciación del granuloma

En la tabla 10 y gráfico 5E se observó que tanto LCM como LCD presentan las mayores AI, sin embargo en LCM predomina el granuloma no diferenciado.

Evaluación morfométrica de las formas activas de LCA según grado de diferenciación del granuloma y parámetros clínicos

-Diferenciación del granuloma vs grosor de la epidermis (E), leishmanina y tamaño de la lesión

En la gráfica 6A se observó que las lesiones LCL con granulomas diferenciados, presentaban E promedio, con leishmanina variable pero con mayor tamaño de las lesiones comparado con el resto del espectro.

En la gráfica 6B se observó que en lesiones LCI con granuloma no diferenciados, presentó el menor tamaño de leishmanina con un tamaño de la lesión promedio.

-Diferenciación del granuloma vs área de infiltrado (AI), leishmanina y tamaño de la lesión

En la gráfica 6C las lesiones LCD granuloma diferenciado mostraron la mayor AI con menor tamaño de la leishmanina y menor tamaño de la lesión.

En la gráfica 6D las lesiones LCM granuloma no diferenciado mostraron la mayor AI con mayor leishmanina y menor tamaño de la lesión.

DISCUSIÓN

Al analizar las características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de cada forma de LCA, se evidenció que en todo el espectro predominó el sexo masculino, a excepción de LCL que la muestra fue equitativa entre hombres y mujeres. Aquellos pacientes con LCL y el LCI la edad más afectada fue la 4ta década de la vida, a diferencia de aquéllos con LCD que fueron más jóvenes, entre los 17-18 años en promedio y en la LCM a los 50 años aproximadamente. Estos resultados pueden deberse a las características inmunológicas de maduración del sistema inmune que predomina en edades extremas de la vida ^(52,53). Clínicamente predominó la úlcera en pacientes con LCL, LCI y LCM, a diferencia de LCD que predominaron los nódulos y placas, concordando con todas las clasificaciones de las formas activas de lesiones de Leishmaniasis en nuestro continente ^(12,13)

El tiempo de evolución de las lesiones en las LCL y LCI eran en promedio de 3 a 5 meses, a diferencia de las lesiones de LCD y LCM que presentaban un mayor tiempo entre 16 y 8 años respectivamente. Analizando el promedio del número y tamaño de las lesiones por paciente LCL fueron menores en cantidad y diámetro con respecto a las demás. La LCD presentó la mayor cantidad de lesiones en promedio con tamaños similares a las observadas en LCL. Por último las LCM presentaban pocas lesiones con menor tamaño de las mismas. De esperar se obtuvo que la leishmanina fue positiva en todos los pacientes con LCL y con LCM pero en este último caso fue de mayor tamaño, mientras que en las LCI fue positiva solo en un 80% y en LCD negativa en un 84.62%. Al realizar PCR para establecer especie de *Leishmania*, se observó que *L. braziliensis* fue responsable de las LCL, mientras que la *L. mexicana* se tipificó en las LCI, LCM y LCD, a excepción en esta última de un caso de *L. venezuelensis*.

Un objetivo del presente estudio fue clasificar a los pacientes de acuerdo a las características histopatológicas descritas por Ridley, Magalhaes y Convit-Reyes ^(36,50,51). En el análisis dermatopatológico según Ridley, las lesiones de los pacientes mostraron un predominio en más del 80% del patrón R-IV, por otro lado al estudiarlos por la clasificación de Magalhaes se observó predominio del patrón M-III y M-IV. La

clasificación según patrón de Reyes Flores-Convit determinó que 54% de las lesiones fueron clasificadas como granuloma a agente vivo.

Ridley señala que los pacientes pertenecientes al grupo R-IV (la mayoría de los pacientes de nuestro estudio) tenían únicamente afectación cutánea, con respuesta favorable al tratamiento o curaron de forma espontánea y no presentaron recaída. Extrapolando lo señalado por Ridley a nuestra investigación, pudiésemos afirmar que más del 80% de los pacientes de nuestro estudio presentan una forma de LCA con excelente pronóstico. En el trabajo de Ridley, R-V eran predominantemente LCM y todos presentaron pobre respuesta terapéutica. El 7,4% de los pacientes de nuestra muestra correspondieron a R-V, pero a diferencia de Ridley predominó en LCL, pudiendo señalar que los mismos tendrían una alta probabilidad de fracaso terapéutico. Estos últimos resultados sugieren la posibilidad que estos pacientes LCL R-V son aquellos que progresarían a futuro una LCM. Un 4% de lesiones fueron clasificadas R-III, recordando que este patrón fue observado por el autor en lesiones de pacientes LCL que progresaron a LCM, por lo que este pequeño pero importante porcentaje debe llamar la atención al clínico ya que su respuesta puede ser variable, presentar recaídas o incluso progresar a LCM ⁽³⁶⁾

Lo expresado previamente denota la importancia de lo descrito por Ridley, ya que logró establecer características histológicas ligadas al tipo de presentación y pronóstico de la LC. Nuestro estudio no buscó evaluar de forma directa la respuesta a largo plazo de los pacientes al tratamiento, ni la incidencia de recaída o compromiso mucoso en un futuro. Nuestro planteamiento es utilizar la escala de Ridley como herramienta indirecta en el pronóstico de la enfermedad, buscando a su vez relaciones estadísticas con los parámetros morfométricos estudiados.

En relación con la clasificación de Magalhaes el 96% presentaron patrones M-II a M-V presentando desde una reacción exudativa necrótica a granulomatosa y finalmente tuberculoide y un 4% de las lesiones fueron clasificadas M-I correspondiendo a una reacción exudativa-celular; de este porcentaje todas las lesiones correspondieron a pacientes LCM.

Magalhaes concluyó que la reacción exudativa-celular (M-I) representa el primer y último patrón de la lesión de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, en nuestro

estudio solo se presentaron 2 pacientes en este patrón. Los otros cuatro patrones histopatológicos caracterizan formas instaladas y crónicas de la enfermedad ⁽⁵¹⁾. De lo anterior podemos concluir que casi la totalidad de los pacientes de nuestro estudio acuden a ser evaluados durante las etapas intermedias de la evolución de la lesión, que coincide con la presencia de hallazgos clínicos característicos, y no en etapas tempranas (pequeña lesión de tipo pápula) ni tardías (lesión en resolución); esto se corroboró también en el estudio de Patiño y Carrera en donde la totalidad de la muestra analizada de LCL presentaban todos los patrones de Magalhaes, excepto M-I, a diferencia de este estudio donde 2 pacientes con lesiones LCM fueron clasificadas como M-I, recordando que este tipo de paciente presentan las lesiones principalmente en cara (mucosa nasal y bucal), por lo que probablemente esto explique el por qué estos pacientes acuden más tempranamente a recibir atención médica, aunado al hecho de ser lesiones dermatológicas estigmatizantes, poco estéticas y que comprometen su función respiratorio o digestiva ⁽²⁸⁾

De lo anterior se plantea que la clasificación de Magalhaes puede ser utilizada como una herramienta indirecta para evaluar evolución de la enfermedad independientemente del tiempo de evolución que refiera el paciente, el cual es una variable subjetiva y poco precisa.

La poca variación de la clasificación histopatológica por los tres patrones de la LCA estudiados la hace poco precisa para correlacionar las características histológicas con los valores morfométricos, a diferencia de Patiño y Carrera (2016) quienes sí pudieron utilizar la escala de Ridley y Maghlaes al analizar las lesiones de LCL ⁽²⁸⁾. La clasificación introducida en este estudio, basada en los resultados histológicos de lesiones de pacientes venezolanos, propuesta por Reyes-Flores y Convit no arrojó los resultados esperados, al no poder permitir una clasificación ajustada de la muestra estudiada ya que el 54% de la muestra clasificada como GAV por compartir características histológicas con otras dermatosis neutrofílicas bien establecidas, sin la visualización del parásito. Sin embargo llama la atención que 10 casos de LCD fueron clasificados en el patrón RC-LCL, pudiendo inferirse histológicamente que éstos pueden presentar un mejor pronóstico por las características de la biopsia; por otro lado 3 casos LCL fueron clasificados en el patrón RC-LCD, por lo que las

características histológicas de estas lesiones podrían hacer sospechar que estos casos progresen a otro espectro de la enfermedad.

A continuación se discutirá los parámetros morfométricos presentes en la muestra.

Dentro del espectro de LCA la lesiones LCM presentaron el mayor grosor de la epidermis y mayor daño tisular expresado por la mayor área de infiltrado pero el menor número de granulomas, predominando el no diferenciado. Fueron muy variables los cambios epidérmicos ocurridos en todo el espectro, desde: acantosis, hiperplasia pseudocarcinomatosa, atrofia, erosiones, ausencia de epidermis, entre otras. De igual forma se demostró una correlación positiva entre el tamaño medido de leishmanina con el tamaño de la lesión ($p < 0,002$) lo que representa que a mayor tamaño de la leishmanina mayor será el tamaño de la lesión y esta correlación podría ser un parámetro morfométrico que relaciones la clínica con la histopatología.

Esta observación, podría ser el resultado del daño tisular, el cual es el más extenso del espectro y podría explicarse porque las mucosas tienden a estar bajo reguladas inmunológicamente en comparación con la piel sana; esta inmunosupresión local le permite no reaccionar tan fácilmente a los antígenos externos a los que está continuamente expuesta ⁽⁴⁶⁾. Además el grupo de Tapia observó un mayor número de linfocitos T CD4 + cooperadores inductores en las lesiones de pacientes con LCM, los cuales son causantes del exacerbado daño tisular de estas lesiones ⁽⁵⁴⁾ Las lesiones de LCL y LCD presentaron una epidermis adelgazada, siendo en las lesiones de LCD la más delgada.

La epidermis de las lesiones de LCL contienen muchos componentes asociados al proceso inflamatorio que incluyen: un apropiado número de células de Langerhans CD1a+, marcada expresión de los queratinocitos de moléculas CMH clase II y la presencia de grupos de queratinocitos que expresan molécula de adhesión intercelular (ICAM-1); ésta última se distribuye en la epidermis de LCL de manera similar a la observada en otros desórdenes dermatológicos y está asociada a la producción de IFN gamma y la migración selectiva de linfocitos T epidermotrópicos. La presencia de parásitos en la piel, induce la producción local de IFN-gamma sin lesiones clínicas de LCL; ésto y otras citoquinas como FNT- β podrían llevar a la expresión de ICAM-1 en los queratinocitos y promover el epidermotropismo de los

linfocitos T. Las células de Langerhans son estimuladas fuertemente por tipos específicos de *Leishmania* y además pueden promover una respuesta efectiva TH1 contra el parásito. Una vez eliminado o reconocido la *Leishmania* por el sistema inmune, las señales epidérmicas accesorias son bajo-reguladas, induciendo el proceso de recuperación del proceso de inmunopatología que generó la lesión, pudiéndose explicar porque la epidermis es delgada a pesar de la respuesta inmunitaria que es efectiva pero controlada, con poco daño tisular en consecuencia (54)

Además, en las lesiones de LCD hay una disfunción de las células presentadoras de antígeno y una anergia selectiva. La epidermis es deficiente en citoquinas y en señales accesorias mediadas por citoquinas que afectan la función de las células presentadoras de antígenos, induciendo la anergia específica contra el parásito. En la epidermis de LCD hay pocas células de Langerhans CD1a+ y los queratinocitos fallan en expresar moléculas CMH clase II o ICAM-1. Esta disparidad en comparación con LCL, puede estar relacionada a la activación celular, desde que se relacionó con la expresión de HB15 asociada a la presentación antigénica y a las interacciones celulares que siguen la activación linfocítica. De hecho, CD83 puede catalogarse como una de las primeras moléculas producidas por células de Langerhans CD1a+ responsables de la presentación antigénica a los linfocitos T de memoria. Además en LCL, las lesiones poseen múltiples señales accesorias necesarias para promover una respuesta inmunitaria efectiva contra la *Leishmania*, a diferencia de LCD donde hay una disfunción epidérmica marcada, lo que podría explicar el por qué presenta el grosor de la epidermis más delgado del espectro (54)

El presente estudio demostró que el área de infiltrado de LCL era el más pequeño del espectro, lo que sugiere una respuesta inmunitaria efectora vigorosa (13,54) Por su parte el área de infiltrado de LCI fue mucho menor, tenía el mayor número de granulomas, lo que pudiera representar una respuesta celular exacerbada pero poco eficiente en eliminar al patógeno. LCM se relacionó con menor número de granulomas de predominio no diferenciado (38,55). Se demostró una correlación negativa entre el área de infiltrado y tamaño de la lesión ($p < 0,02$), lo que representa que a mayor tamaño de la lesión menor área de infiltrado; sin embargo hay que

destacar que el área de infiltrado no está relacionado directamente con la eficiencia del sistema inmunitario para eliminar al parásito y esto depende del grado de organización del granuloma. Esta correlación encontrada podría representar otro parámetro morfométrico que relacione lo que observa el dermatólogo con los hallazgos histológicos.

En resumen, LCM presenta un mayor grosor de la epidermis asociado a un área de infiltrado mayor y una leishmanina elevada, los resultados morfométricos que confirman la respuesta inmunitaria exacerbada característica de esta forma clínica de LCA. En contraste, las lesiones de LCL presentan epidermis adelgazada, el menor área de infiltrado y una leishmanina muy variable que contrasta entre valores bajos y altos, características que pudiesen estar asociadas con un estado intermedio de la respuesta inmunitaria que pudiera desarrollar formas LCL o LCM. En la LCD los resultados morfométricos se presentaron como una epidermis adelgazada con gran área de infiltrado formando poco número de granulomas con predominio a ser diferenciados y con numerosas lesiones pequeñas, lo cual representa un granuloma macrofágico con respuesta inmunitaria incapaz de eliminar al parásito el cual utiliza esa topografía celular para hacerse invisible y evadirla ⁽⁵⁴⁾.

Las lesiones por *L. mexicana* evaluadas en el estudio se caracterizaron morfométricamente por presentar mayor grosor de la epidermis, mayor número de granulomas y mayor área de infiltrado. Sin embargo no se observó mayor variación con respecto al grado de diferenciación de los granulomas entre las especies de *L. mexicana* y *L. braziliensis*. El análisis histopatológico demostró diferencias entre estas dos especies con respecto al grado de diferenciación del granuloma en donde *L. mexicana* desarrolló un predominio de granulomas diferenciados y *L. braziliensis* presentó granulomas de ambos tipos, predominando el diferenciado ⁽⁴⁶⁾.

Cuando se dividen las formas clínicas de LCA con base a la diferenciación del granuloma, en los granulomas bien diferenciados de LCL hay mayor grosor de la epidermis, área del infiltrado menor, con leishmanina positiva en rangos convencionales y tamaño de las lesiones mayores, en contraste con LCD donde hay menor grosor de la epidermis, mayor área de infiltrado, leishmanina y tamaño de lesiones menores. En los casos de LCL con granulomas bien diferenciados, hay una

activación de la epidermis desde el punto de vista inmunológico, con una mezcla de respuesta TH1 y TH0, con predominio de citoquinas TH1 como IFN-gamma e IL-4 y bajos niveles de IL-5 e IL-10, que permiten la activación de células de Langerhans que capturan antígenos del parásito y promueven la salida del epitelio hacia el ganglio linfático circunvecino. En este ganglio linfático, sucede la presentación antigénica de los antígenos por las células de Langerhans a los linfocitos T vírgenes circulantes, los cuales se transforman en linfocitos T efectores encargados de eliminar a los parásitos en el sitio inicial de la injuria en conjunto con la activación de macrófagos para el control de la enfermedad ^(54,56).

El presente estudio plantea la posibilidad de utilizar la morfometría como una herramienta certera y complementaria en el estudio de la leishmaniasis, en búsqueda de mejor categorización y terapéutica de los pacientes y constituye un primer acercamiento morfométrico en la búsqueda de signos pronóstico y evolutivos en los pacientes de todo el espectro de LCA.

Enfatizamos que los patrones R-III y R-V, asociados a granulomas no diferenciados, deben ser reevaluados constantemente por la probabilidad de: no responder a tratamiento, recaer o progresar de LCL a LCM.

Se sugiere la realización de futuros estudios de morfometría en leishmaniasis, ampliando la muestra de pacientes con LCA, que permita en un futuro estandarizar los resultados morfométricos obtenidos y desarrollar estudios que evalúen la morfometría de los tres patrones histológicos utilizados en todo el espectro de LCA.

La morfometría mediante el uso de un analizador de imágenes pudiese ser también aplicada en el estudio de diversas enfermedades dermatológicas, como el vitíligo, pudiendo el programa contabilizar de forma automática la cantidad de melanina presente, siendo una posible herramienta para evaluar respuesta terapéutica de forma objetiva. La medición del área de epidermis puede ser una herramienta en el estudio de enfermedades que cursen con alteración de su grosor, como la psoriasis, así como el aplicar el método de inmunohistoquímica para conocer determinado tipo celular, y aplicar el conteo celular automático con el software Image Pro Plus® puede tener implicaciones pronósticas y terapéuticas en diversas enfermedades cutáneas.

Esta investigación que evaluó la morfometría de lesiones de pacientes con LCA, muestra que esta metodología podría ser útil para mejorar las clasificaciones de las formas activas de leishmaniasis, constituyendo un primer acercamiento morfométrico en la búsqueda de signos pronósticos o de progresión de la enfermedad en todo su espectro, evaluándose cambios clínicos, epidemiológicos, parasitológicos y morfométricos, donde existen diferencias importantes en la respuesta inmunitaria, antecediendo esta investigación la hecha por Patiño y Carrera en el mismo grupo de investigación que solo evaluaron la forma cutánea localizada.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Biología Molecular de nuestro Instituto de Biomedicina, especialmente a la Lic. Orquídea Rodríguez, por su paciencia y enseñarnos a manejar el programa morfométrico, así como la estadística necesaria del trabajo y a nuestro Tutor el Dr. Félix Tapia por creer en nosotras y por motivarnos a ser siempre mejores.

Al servicio de Leishmaniasis del Instituto Autónomo de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, especialmente a la licenciada María Eugenia Ortega y Richard Villegas por ayudarnos con la recolección de las historias médicas y biopsias.

Al Dr. Oscar Reyes Jaimes, dermatopatólogo y adjunto del departamento de dermatopatología del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, por la lectura de las biopsias y clasificación de los pacientes en los patrones histológicos.

REFERENCIAS

1. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:239-243.
2. Ashford R. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30:1269-1281.
3. World Health Organization. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishmaniasis>. pdf (accesado el 11/Enero/2018).
4. Remme J, Blas E, Chitsulo L, Desjeux P *et al.* Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Parasitol.* 2002;18:421-426.
5. D'Suze C, García C. Epidemiología de la Leishmaniasis. *Rev Dermatol Ven.*1993;31:4-11.
6. Rondón A.J. Leishmaniasis. *Rev Dermatol Ven.* 1993;31:3-7.
7. Sánchez-Saldaña L, Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R *et al.* Leishmaniasis. *Dermatol Per.* 2004;14:81-98.
8. Arias J, Beltran F, Desjeux P, Walton B. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país y territorio. Cuaderno técnico 44. Washington DC: Oficina Sanitaria Panamericana; 1996.
9. De Lima H, Borges R, Escobar J, Convit J. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* Vol. LI, Nº 2, Agosto-Diciembre, 2011.
10. Ortega J, Zerpa O, Sosa A, Aranzazu N *et al.* Estudio clínico, epidemiológico y caracterización taxonómica de Leishmaniasis cutánea en el Estado Vargas, Venezuela. *Rev Dermatol Ven.* 2004,43:10-16.
11. Estadísticas de Leishmaniasis Cutánea en Venezuela. Histórico / Año 1990-2016. Coordinación Nacional del Programa de Leishmaniasis. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit".
12. Rondón A, Zerpa O, Capozzi E. Leishmaniasis Cutáneo- Mucosa. En: Iturriaga E, Torres J, Ríos A. *Enfermedades Tropicales en Otorrinolaringología.* Sociedad Venezolana de Otorrinolaringología. Caracas, 2001:39-56.

13. Weigle K, Gore N. Natural History, Clinical Evolution, and the Host-Parasite Interaction in New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996;14:433-450.
14. Toro M, Manriquez G, Suazo I. Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *Int J Morphol.* 2010;28:977-990.
15. Fernandes-Santos C, Souza-Mello V, Da Silva T, Mandarin-de-Lacerda C.A. Quantitative Morphology Update: Image Analysis. *Int J Morphol.* 2013; 31:23-30.
16. Prodanov D, Verstreken K. Automated Segmentation and Morphometry of Cell and Tissue Structures. *Selected Algorithms in ImageJ. Molecular Imaging.* Capítulo 8, Bélgica: editor Prof. Bernhard Schaller, InTech; 2012.
17. Fernandes-Santos C, Mendonca L.S, Aguilá M.B, Mandarin-de-Lacerda C.A. Favorable cardiac and Aortic Remodeling in Olmesartan- Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Heart Vessels.* 2009;24:219-227.
18. Fernandes-Santos C, Carneiro R.E, Mendonca L.S, Aguilá M.B, Mandarin-de-Lacerda C.A. Pan-PPAR Agonist Beneficial effects in Overweight Mice Fed with a High-fat High-sucrose Diet. *Nutrition.* 2009;25:818-827.
19. Fernandes-Santos C, Carneiro R.E, Mendonca L.S, Aguilá M.B *et al.* Rosiglitazone Aggravates Nonalcoholic Fatty Pancreatic Disease in C57BL/6 Mice Fed High-fat and High-sucrose diet. *Pancreas.* 2009;38:e80-e86.
20. De Melo F.C, De Sousa T.P, Costa K.L, Da Matta S.L *e al.* Descriptive Morphometry and Stereology of the Tubular Compartment in the Wild Rodent (*Hylaeamys megacephalus*) from Central Brazil. *Anim Reprod Sci.* 2013;138:110-117.
21. Verçosa BLA, Melo MN, Del Puerto HL, Mendonça IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of Leishmania (*Leishmania*) chagasi naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. *Vet Parasitol.* 2012; 189:162-170.
22. Papavdi A, Kornaraki G, Nikitakis A, Michalodimitrakis M. The Vulnerable Atherosclerotic Plaque. Evaluation of the Lipid Core in Human Coronary Arteries Using Morphometry. *Am J Forensic Med Pathol.* 2012; 33:37-40.

23. Mei Y, Tang Z, Ki Z, Yang X. Repeatability and Reproducibility of Quantitative Corneal Shape Analysis After Orthokeratology Treatment Using Image-Pro Plus® software. *J Ophthalmol*. 2016;1-7.
24. Grossi J.V, Nicola F.F, Zepeda I.A, Becker M *et al*. Linea Alba Collagen Assessment in Morbidly Obese Patients. *Arq Bras Cir Dig*. 2016;29:8-11.
25. Modera Y, Delgado J, González L, Montero J *et al*. Estudio morfométrico comparativo del tratamiento con Calcipotriol y anticuerpo monoclonal ior t 1 tópico en pacientes psoriáticos. *Rev CENIC*. 2000;31:121-127.
26. Aydin F, Senturk N, Sahin B, Bek Y *et al*. A Practical Method for the Estimation of Vitiligo Surface Area: a Comparison between the Point Counting and Digital Plainmetry Techniques. *Eur J Dermatol*. 2007;17:30-32.
27. Alghamdi K.M, Kumar A, Taiieb A, Ezzedine K. Assessment Methods for the Evaluation of Vitiligo. *JEAD*. 2012;26:1463-1471.
28. Carrera C, Patiño P. Morfometría de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y su posible valor diagnóstico. Trabajo Especial de Grado para optar a título de Especialista en Dermatología y Sifilografía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Caracas. 2016.
29. Control de las Leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el control de las Leishmaniasis. Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010.
30. Rosal T, Baquero-Artigao F, García M. Leishmaniasis cutánea. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2010;12:263-271.
31. Bonfante R, Barruela S. Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002.
32. De Gopugui MR, Ruiz R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int J Dermatol*. 2003;37:801-814.
33. Lainson R, Shaw J, Silveira F, De Souza A *et al*. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 1994;89:435-443.
34. Magill AJ. Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatol Clin*. 1995;13:505-523.

35. Pearson R, Queiroz A. Especies de *Leishmania*: Leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa. En: Mandell, Douglas, Benett. Enfermedades infecciosas, principios y práctica. 4ta ed. Buenos Aires: Panamericana Ed, 1997:2724-35.

36. Reyes-Flores, O. Histopatología de la leishmaniasis. Dermatol Venez. 1993; 31:22-23.

37. Goto H, Lauletta J. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. Infec Dis Clin N Am. 2012;26:293-307.

38. Diaz N, Zerpa O, Ponce L, Tapia FJ *et al.* Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. Exp Dermatol. 2002;11:34-41.

39. Grevelink S, Lerner E. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996;34:257-270.

40. Farah F, Klaus N, Frankeburgs. Infecciones por Protozoarios y Helminetos. En: Fitzpatrick T. Dermatología en Medicina General. Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana. 1999;3:2767-2777.

41. Bonfante R, Barruela S. Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. 2002.

42. Tremblay M, Oliver M, Bernier R. Leishmania and the pathogenesis of HIV. infection. Parasitol Today. 1996;12:257-261.

43. Matte C, Oliver M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: Modulation of proinflammatory mediators. J Infect Dis. 2002;185:673-681.

44. Pearson RD, De Quiroz Sousa A. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infec Dis. 1996;22:1-13.

45. Moll H, Berberich Ch. Dendritic cell-based vaccination strategies: Induction of protective immunity against leishmaniasis. Immunol. 2001;204:659-666.

46. Convit J, Ulrich M, Fernández C.T, Tapia, F.J *et al.* The Clinical and Immunological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87:444-448.

47. Cabrera M, Terán-Ángel G, Rodríguez O, Puccio F *et al.* Citocinas Reguladoras (IL-10 y TGF- β) en Pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana. Bol Mal Salud Amb. 2010;1:243-250.

48. Hernández-Ruiz J, Becker I. Linfocitos T Citotóxicos CD8+ en la Leishmaniasis Cutánea. *Salud Pública de Méx.* 2006; 48:430-439.
49. Corado J. Células Dendríticas, Respuesta Inmunitaria y Señales de Peligro. *Gac Méd Caracas.* 2005;113:474-484.
50. Ridley D, Marsden P, Cuba C, Barreto A. A Histological Classification of Mucocutaneous Leishmaniasis in Brazil and its Clinical Evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74:508-514.
51. Magalhaes A, Morales M, Raick A, Llanos-Cuentas A, et al. Histopathology of Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania braziliensis*. Histopathological Patterns and Evolutive Study of the Lesions. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1986;28:253-262.
52. Miller R. The Aging Immune System: primer and prospectus. *Science.* 1996;273:70-74.
53. Wick G, Grubeck-Loebenstein B. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity. *Exper Gerontol.* 1997;32:401-413.
54. Tapia JF, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous Leishmaniasis. *Inmunol today.* 1994;160-165.
55. Halmai-Stupar O, Arosemena-Sarkissian R, Páez E, Rondon A *et al.* American Cutaneous Leishmaniasis: Intermediate Form. *Int J Dermatol.* 1993;32:204-205.
56. Tapia FJ, Rodríguez OL, Sánchez MA. Tegumentary Leishmaniasis: Immunology and molecular biology. *Az méd Bahia.* 2009;79:84-90.

ANEXO 1.-

ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD Y NO DIVULGACIÓN DE INFORMACIÓN

Nosotras, las autoras de este Trabajo Especial de Grado para optar al título de Especialista en Dermatología y Sifilografía, titulado: **“MORFOMETRÍA DIGITAL Y PATRONES HISTOLÓGICOS EN LAS FORMAS ACTIVAS DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA AMERICANA”**

- **Natiant Sofía Figueroa Polanco, C.I. 18.248.859 y**
- **Mariaesther de la Guadalupe Vásquez Chirinos, C.I 17.667.182,**

Nos comprometemos a la no divulgación de la información obtenida según los objetivos que dirigen dicha investigación.

Natiant Sofía Figueroa Polanco

C.I. 18.248.859

Autora

Mariaesther de la Guadalupe Vásquez Chirinos

C.I 17.667.182

Autora

ANEXOS 2.-

Tabla 1. Variables demográficas y diagnósticas

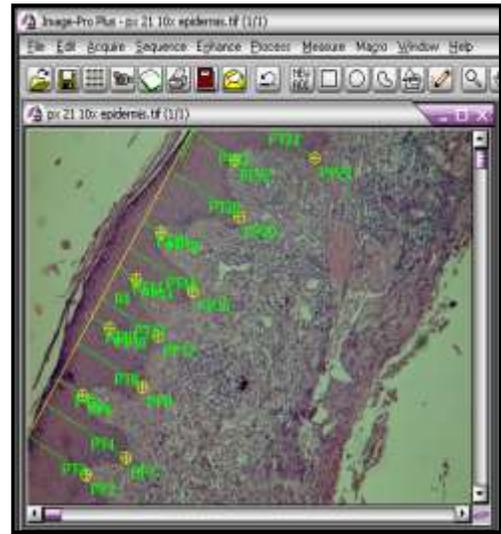
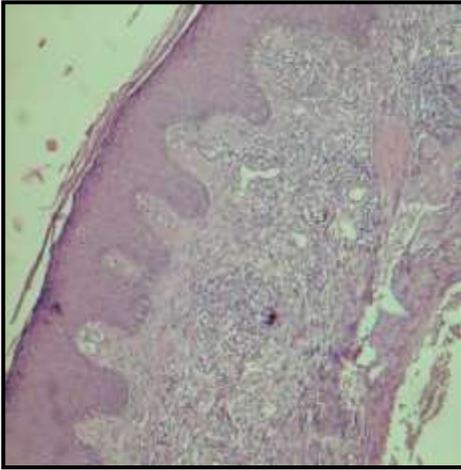
<i>Variable</i>	<i>Definición Conceptual</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Naturaleza de la Variable</i>	<i>Tipo de valor de la variable</i>	<i>Nivel de medición de la variable</i>
Edad	Años de vida de los pacientes	Independiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Sexo	Género del paciente	Independiente	Cualitativa	Comparativa	Nominal
Procedencia	Lugar de residencia	Independiente	Cualitativa	Comparativa	Nominal
Tipo de lesión	Descripción semiológica de la lesión activa de LC	Dependiente	Cualitativa	Comparativa	Nominal
Localización de la lesión	Ubicación anatómica de la lesión activa de LC	Dependiente	Cualitativa	Comparativa	Nominal
Número de lesiones	Cantidad de lesiones activas de LC	Dependiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Tamaño de las lesiones	Diámetro medido en mm de la lesión activa más grande de LC	Dependiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Leishmanina	Intradermoreacción.	Dependiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Frotis por escarificado	Método diagnóstico parasitológico de LC	Dependiente	Cualitativa	Comparativa	Nominal
Patrón de Ridley	Clasificación histopatológica de la LC	Independiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Patrón de Magalhaes	Clasificación histopatológica de la LC	Independiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Patrón de Reyes-Convit	Clasificación histopatológica de la LC	Independiente	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
PCR	Inmunodetección del parásito de LC por género y especie	Dependiente	Cualitativa	Comparativa	Nominal

Tabla 2. Variables morfométricas

<i>Variable</i>	<i>Definición Conceptual</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Naturaleza de la Variable</i>	<i>Tipo de valor de la variable</i>	<i>Nivel de medición de la variable</i>
<i>Epidermis</i>	Grosor de la capa superficial de la piel	Dependiente	Cuantitativo	Continua	Ordinal
<i>Área de infiltrado inflamatorio</i>	Área de células nucleadas presentes en la dermis	Dependiente	Cuantitativo	Continua	Ordinal
<i>Número de granulomas</i>	Número de áreas de infiltrado presentes en dermis	Dependiente	Cuantitativo	Continua	Ordinal

Imagen 1. Análisis morfométrico

A. Grosor de epidermis



B. Área de infiltrado y número de granulomas

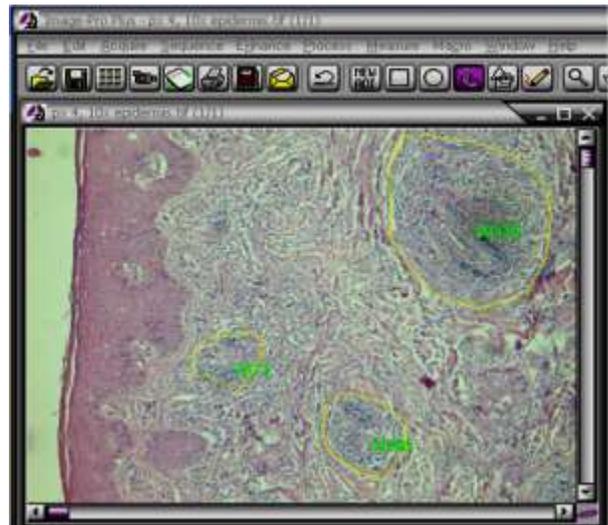
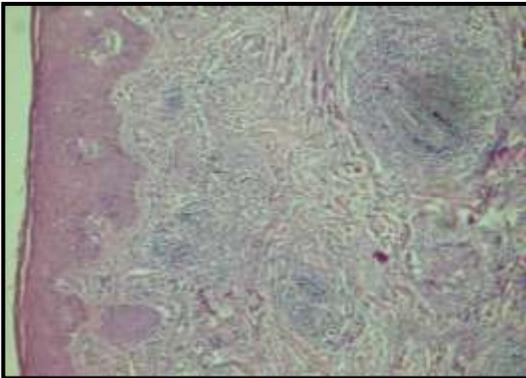


Tabla 3. Características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de los pacientes con Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

Núm	Historia	Edad (años)	Sexo	Procedencia (por estado)	Clínica	Localización	Tiempo de evolución (meses)	Número de lesiones	Tamaño (mm)	Leishmanina (mm)	FPE	PCR (Género y especie)
1	1-3058	40	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	2	20	15	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
2	1-3089	51	M	Vargas	Úlcera	Extremidades	2	1	14	14	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
3	1-3073	34	F	Vargas	Úlcera	Extremidades	3	2	6	13	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
4	1-3040	48	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	1	4	17	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
5	1-3120	41	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	1	20	10	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
6	1-2989	12	M	Vargas	Úlcera	Extremidades	2	3	18	25	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
7	1-3094	31	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	1	31	13	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
8	1-3047	38	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	1	20	20	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
9	1-3111	16	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	1	32	15	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
10	1-3059	50	F	Táchira	Úlcera	Extremidades	5	1	24	20	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
11	1-3051	30	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	1	7	15	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
12	1-3116	36	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	1	35	20	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
13	1-3052	67	F	Aragua	Úlcera	Extremidades	1	1	15	21	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
14	1-3041	43	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	3	30	15	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
15	1-3117	19	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	4	1	30	10	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
16	1-3054	44	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	3	29	12	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
17	1-3053	36	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	3	1	25	16	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
18	1-3100	52	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	2	28	15	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
19	1-3049	48	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	1	21	12	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
20	1-3078	20	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	1	25	12	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
21	1-3056	44	M	Amazonas	Úlcera	Extremidades	5	1	13	14	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
22	1-2880	41	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	1	80	14	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
23	1-2971	35	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	48	1	50	25	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
24	1-3036	34	M	Aragua	Úlcera	Extremidades	1	1	70	15	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
25	1-2979	24	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	1	3	60	13	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
26	1-2973	24	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	3	2	70	40	Negativo	<i>L. braziliensis</i>
27	1-8284	54	M	Vargas	Úlcera	Tronco	1	5	10	12	Positivo	<i>L. braziliensis</i>
28	1-2994	6	F	Miranda	Pápula	Cara	6	1	5	0	Negativo	<i>L. braziliensis</i>

Fuente: Historias médicas Consulta servicio de Leishmaniasis IBM

Tabla 4. Características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de los pacientes con Leishmaniasis Cutánea Intermedia (LCI)

Núm	Historia	Edad (años)	Sexo	Estado	Clínica	Localización	Tiempo de evolución (meses)	Núm de lesiones	Tamaño (mm)	Leishmanina (mm)	FPE	PCR (Género y especie)
1	5-577	21	M	Miranda	Úlcera	Cara, tronco, extremidades	8	4	30	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
2	5-637	46	M	Miranda	Pápula úlcera	Extremidades	3	1	6	22	Positivo	<i>L. mexicana</i>
3	1-211	60	M	Miranda	Úlcera	Extremidades	2	1	5	22	Positivo	<i>L. mexicana</i>
4	1-3454	17	F	Miranda	Úlcera	Extremidades	6	1	40	9	Positivo	<i>L. mexicana</i>
5	1-3271	54	F	Miranda	Nódulo, úlcera	Tronco, extremidades	3	8	28	15	Positivo	<i>L. mexicana</i>

Fuente: Historias médicas Consulta servicio de Leishmaniasis IBM

Tabla 5. Características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de los pacientes con Leishmaniasis Muco-Cutánea (LMC)

Núm	Historia	Edad (años)	Sexo	Estado	Clínica	Localización	Tiempo de evolución (meses)	Núm de lesiones	Tamaño (mm)	Leishmanina (mm)	FPE	PCR (Género y especie)
1	5-625	61	M	Portuguesa	Úlcera	Mucosa	480	1	20	13	Negativo	<i>L. mexicana</i>
2	5-555	48	M	Portuguesa	Placa	Mucosa	48	1	8	9	Positivo	<i>L. mexicana</i>
3	5-724	48	M	Bolívar	Úlcera	Mucosa	96	2	5	25	Negativo	<i>L. mexicana</i>
4	5-648	48	M	Zulia	Úlcera	Mucosa	12	1	10	25	Positivo	<i>L. mexicana</i>
5	5-568	62	M	Trujillo	Úlcera	Mucosa	48	2	15	15	Positivo	<i>L. mexicana</i>
6	5-247	52	M	Portuguesa	Placa	Mucosa	6	2	8	36	Negativo	<i>L. mexicana</i>
7	5-657	31	F	Miranda	Pápula úlcera	Mucosa	5	1	8	22	Negativo	<i>L. mexicana</i>

Fuente: Historias médicas Consulta servicio de Leishmaniasis IBM

Tabla 6. Características clínico-epidemiológicas y parasitológicas de los pacientes con Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

Núm	Historia	Edad (años)	S e x o	Estado	Clinica	Localización	Tiempo de evolución (meses)	Núm de lesiones	Tamaño (mm)	Leishmanina (mm)	FPE	PCR (Género y especie)
1	5-194	8	M	Apure	Pápula Nódulo	Tronco Extremidades	336	60	10	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
2	5-637	25	M	Lara	Nódulo Placa	Cara, tronco, Extremidades	264	40	12	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
3	5-646	2	M	Guárico	Pápula Úlcera	Cara Extremidades	10	4	16	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
4	5-611	16	M	Lara	Pápula Nódulo	Cara, tronco, Extremidades	6	29	12	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
5	5-617	7	M	Guárico	Placa	Cara, tronco, Extremidades	13	4	46	17	Positivo	<i>L. mexicana</i>
6	5-640	40	M	Guárico	Pápula Placa	Cara Tronco	18	17	24	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
7	5-05	15	M	Lara	Úlcera	Cara Extremidades	48	9	5	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
8	5-639	12	M	Apure	Nódulo	Cara, tronco, Extremidades	504	>100	8	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
9	5-104	4	M	Anzoátegui	Nódulo Placa	Cara, tronco, Extremidades	660	38	9	15	Positivo	<i>L. mexicana</i>
10	5-69	7	M	Miranda	Úlcera	Cara Extremidades	48	>100	10	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
11	5-346	7	M	Aragua	Pápula Nódulo Placa	Cara, tronco, Extremidades	12	>100	10	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>
12	5-38	33	F	Miranda	Pápula Nódulo Placa	Cara, tronco, Extremidades	300	>100	12	0	Positivo	<i>L. venezuelensis</i>
13	5-76	31	F	Guárico	Nódulo Placa	Cara, tronco, Extremidades	300	>100	8	0	Positivo	<i>L. mexicana</i>

Fuente: Historias médicas Consulta servicio de Leishmaniasis IBM

Tabla 7. Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* según estados de Venezuela.

Género y especie	Estado	N	Porcentaje (%)	Tipo LCA
<i>L. braziliensis</i>	Miranda	22	71.44	LCL
	Vargas	3	14,28	
	Táchira	1	4.76	
	Aragua	1	4.76	
	Amazonas	1	4.76	
	Total	28	100	
<i>L. venezuelensis</i>	Miranda	1	7.14	LCD
<i>L. mexicana</i>	Guárico	5	35.71	
	Lara	3	21.43	
	Apure	2	14.29	
	Miranda	1	7.14	
	Aragua	1	7.14	
	Anzoátegui	1	7.14	
	Total	14	100%	
	Miranda	4	80%	LCI
	Distrito Capital	1	20%	
	Total	5	100%	
	Portuguesa	3	42,85	LCM
	Bolívar	1	14,29	
	Miranda	1	14,29	
	Trujillo	1	14,29	
	Zulia	1	14,29	
	Total	7	100%	

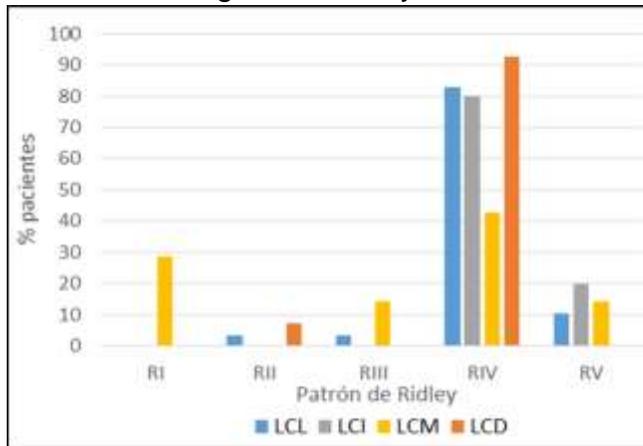
Fuente: Historias médicas Consulta servicio de Leishmaniasis IBM

Tabla 8. Distribución de las formas clínicas de LCA según los patrones histopatológicos de Ridley, Magalhaes y Reyes-Convit

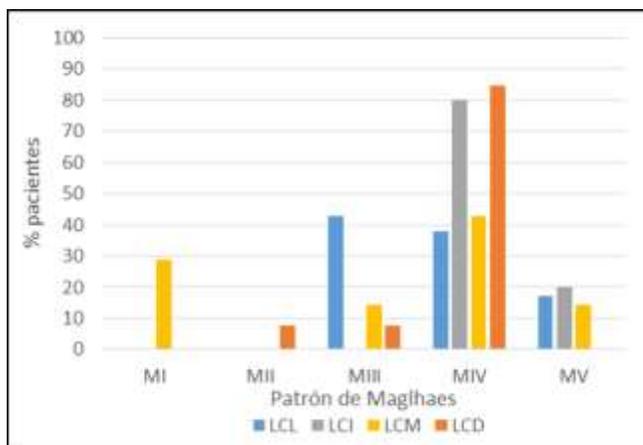
Tipo de LC	Ridley					Magalhaes					Reyes-Convit			
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	LCL	LCD	LCM	GAV
LCL	0	1 3,5 %	1 3,5%	24 82,7%	3 10,3%	0	0	13 44,82 %	11 37,9%	5 17,3%	7 24,2%	3 10,3%	0	19 65,5%
LCI	0	0	0	4 80%	1 20%	0	0	0	4 80%	1 20%	3 60%	0	0	2 40%
LCM	2 28,62 %	0	1 14,29 %	3 42,8%	1 14,29 %	2 28,62 %	0	1 14,29 %	3 42,8%	1 14,29 %	0	0	0	7 100%
LCD	0	1 7,3 %	0	12 92,7%	0	0	1 7,7 %	1 7,7%	12 84,6%	0	10 76,9%	2 15,3%	0	1 7,8%

Gráfico 1. Distribución de las formas activas de LCA según patrones histológicos

A.- Patrón histológico de Ridley



B.- Patrón histológico de Magalhaes



C.- Patrón histológico de Reyes-Convit

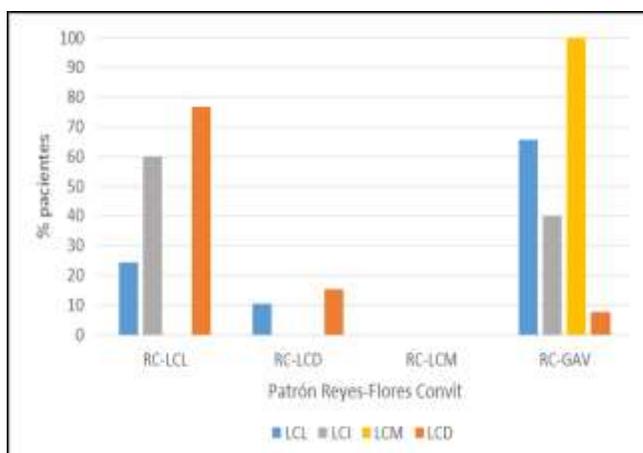
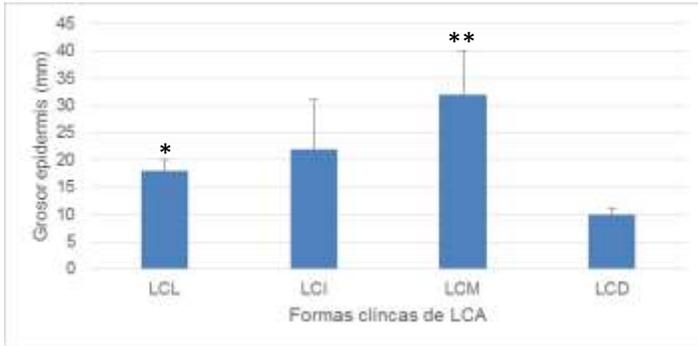


Gráfico 2. Evaluación morfométrica de las lesiones de pacientes con LCA

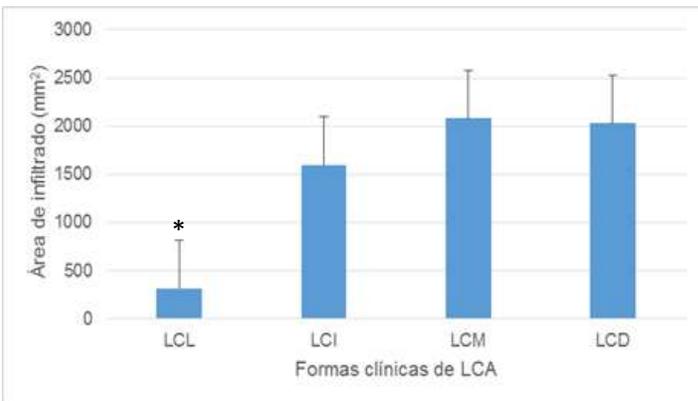
A.- Grosor de la Epidermis



* ($p < 0,05$) en comparación con LCM, LCD

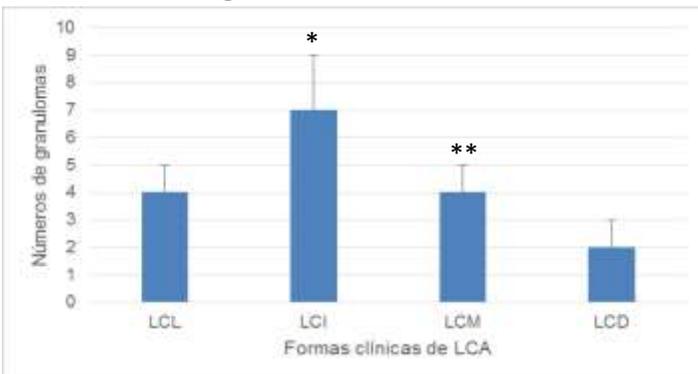
** ($p < 0,001$) en comparación con LCD

B.- Área de Infiltrado



* ($p < 0,001$) en comparación con LCI, LCM, LCD

C.- Número de granulomas

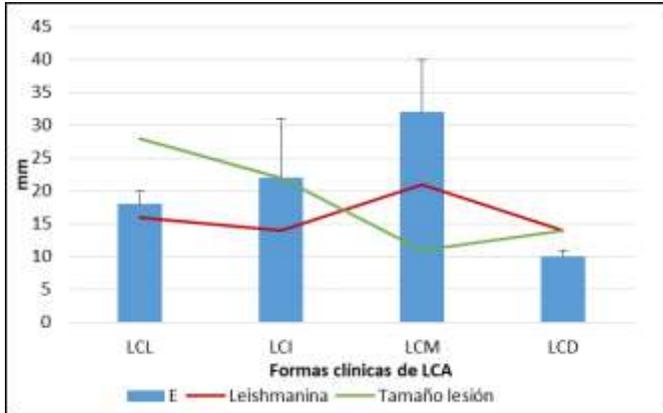


* ($p < 0,05$) en comparación con LCL, LCM, LCD

** ($p < 0,05$) en comparación con LCD

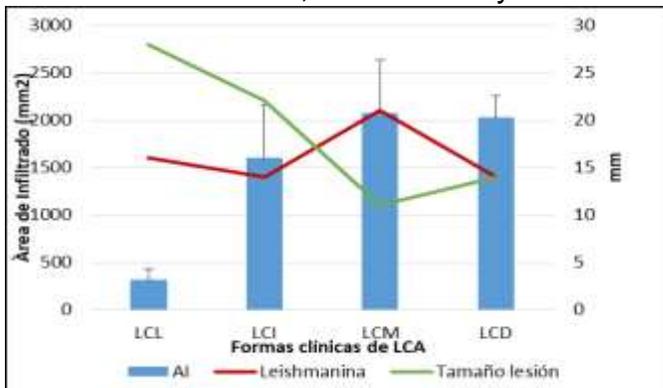
Gráfica 3. Evaluación morfométrica de las lesiones de pacientes con LCA y su relación con las características clínicas

A.- Grosor de la epidermis, leishmanina y tamaño de la lesión



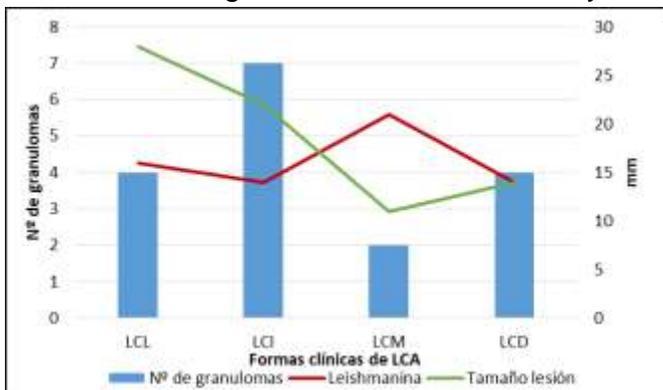
Correlación Spearman E vs Leishmanina = 0,40 (p= 0,002)

B.- Área de Infiltrado, leishmanina y tamaño de la lesión



Correlación Spearman AI vs tamaño lesión = - 0,313 (p= 0,02)

C.- Número de granulomas, leishmanina y tamaño de la lesión



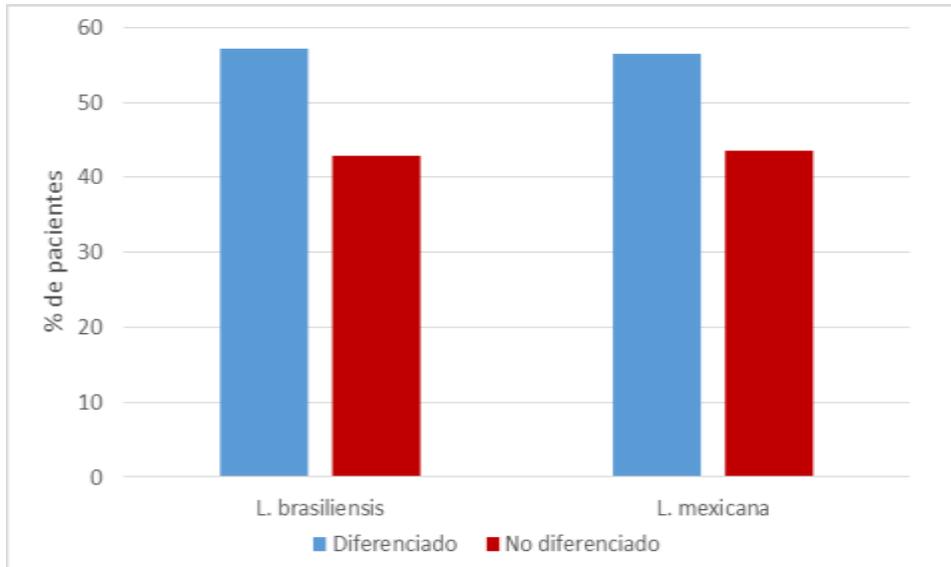
No se encontró correlación

Tabla 9. Grosor de la epidermis (E), área de infiltrado (AI), formas clínicas de LCA y especies de *Leishmania*

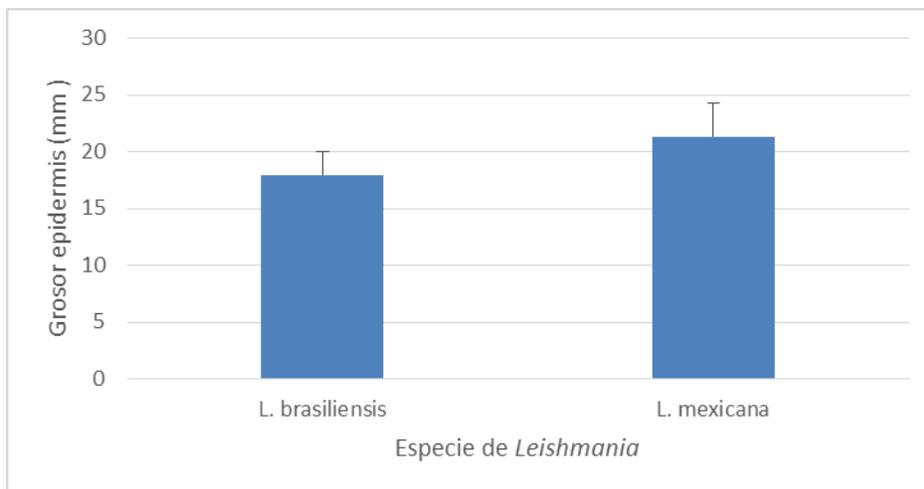
Variable promedio	Especies de Leishmanias		
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. venezuelensis</i>
	LCL		
E (mm)	6,79	0	0
AI (mm ²)	317,98	0	0
	LCI		
E (mm)	0	21,79	0
AI (mm ²)	0	9,93	0
	LCM		
E (mm)	0	32,28	0
AI (mm ²)	0	2079,22	0
	LCD		
E (mm)	0	10,31	9,03
AI (mm ²)	0	2019,84	1127,35

Gráfico 4. Evaluación morfométrica de las formas de LCA según las especies de *Leishmania*

A.- Diferenciación del granuloma

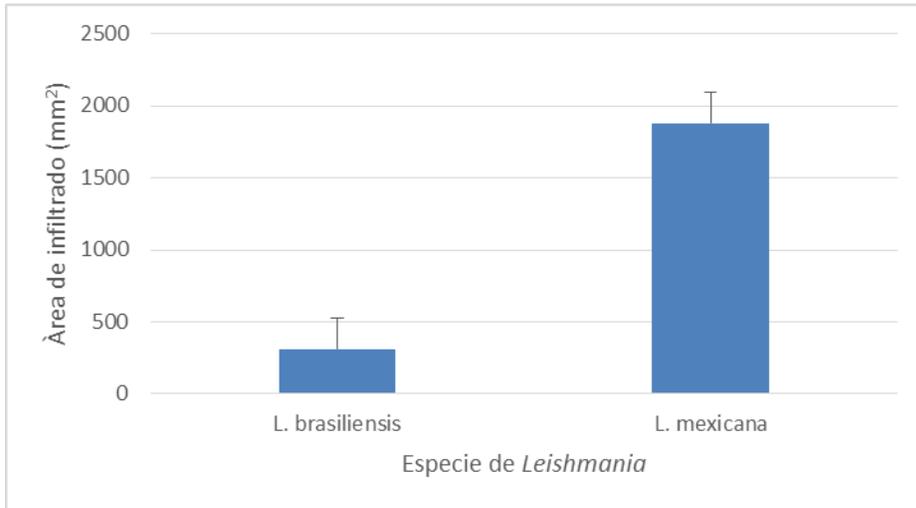


B.- Grosor de la Epidermis



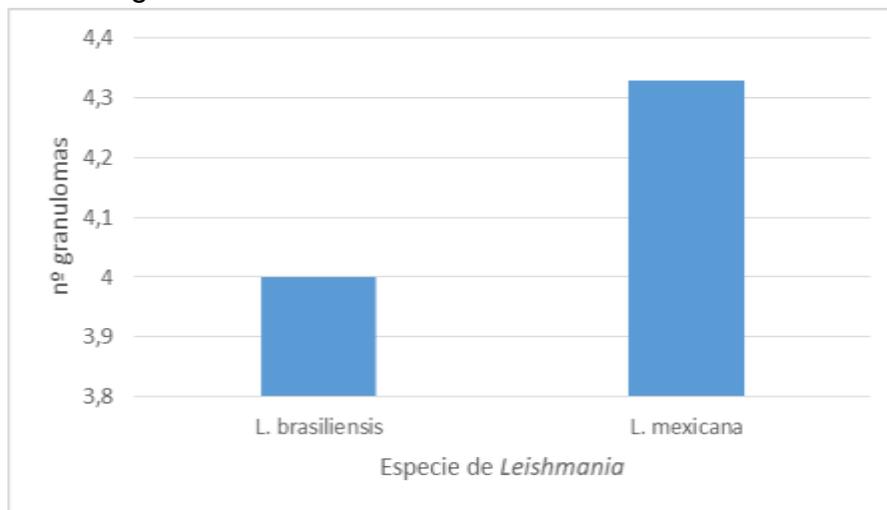
* ($p < 0,0001$)

C.- Área de Infiltrado



* $p < 0,0001$

D.- Número de granulomas



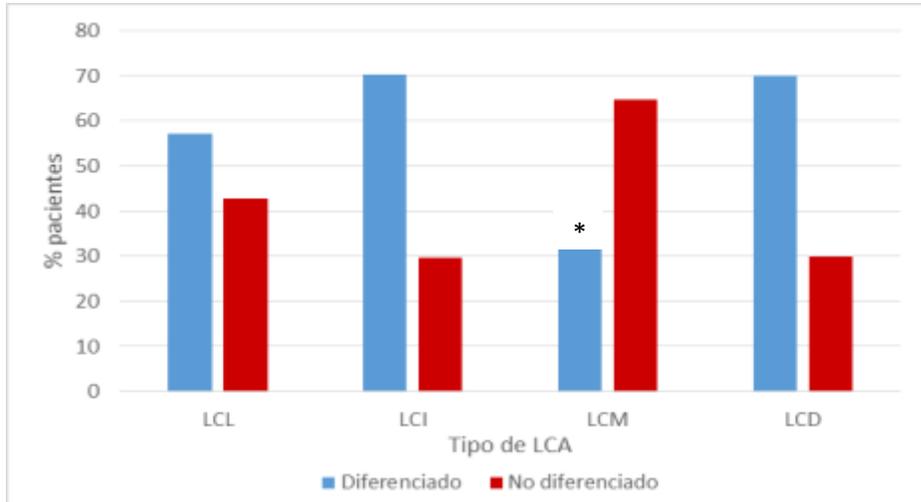
No se encontraron diferencias significativas en el número de granulomas de las lesiones producidas por *L. brasiliensis* y las producidas por *L. mexicana*

Tabla 10. Grado de diferenciación del granuloma y morfometría de los diversos tipo de LCA.

Variable promedio	Tipos de Leishmaniasis							
	LCL		LCD		LCI		LCM	
	Diferenciado	No diferenciado	Diferenciado	No diferenciado	Diferenciado	No diferenciado	Diferenciado	No diferenciado
(E) (mm)	29,16	22,48	10,31	10,35	22,48	24,08	22,51	33,68
AI (mm)	871,5	1652	2030,49	2047,61	10,21	10,86	767,64	2291,17
Número de granulomas	4,5	3,33	4,29	4,38	7,4	7,97	6	1,92

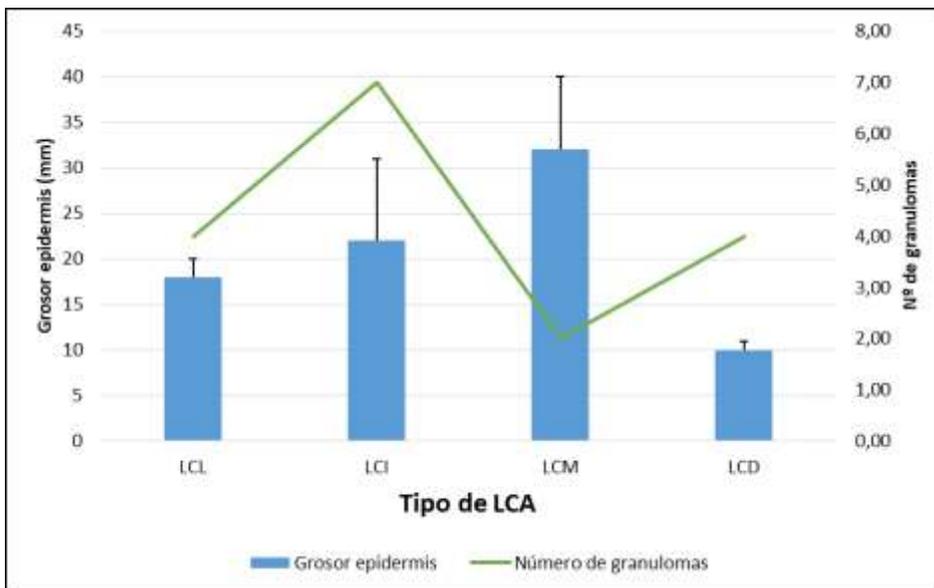
Gráfico 5. Evaluación morfométrica de las formas de Leishmaniasis Cutánea Americana según el granuloma

A.- Grado de diferenciación



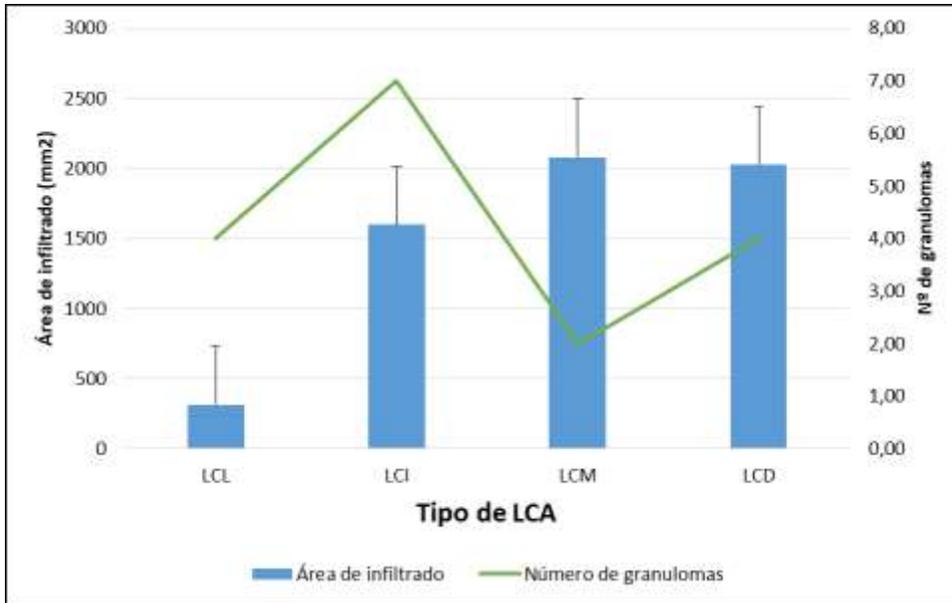
* $p < 0,001$ en comparación con LCL, LCI, LCD

B.- Grosor de epidermis y número de granulomas



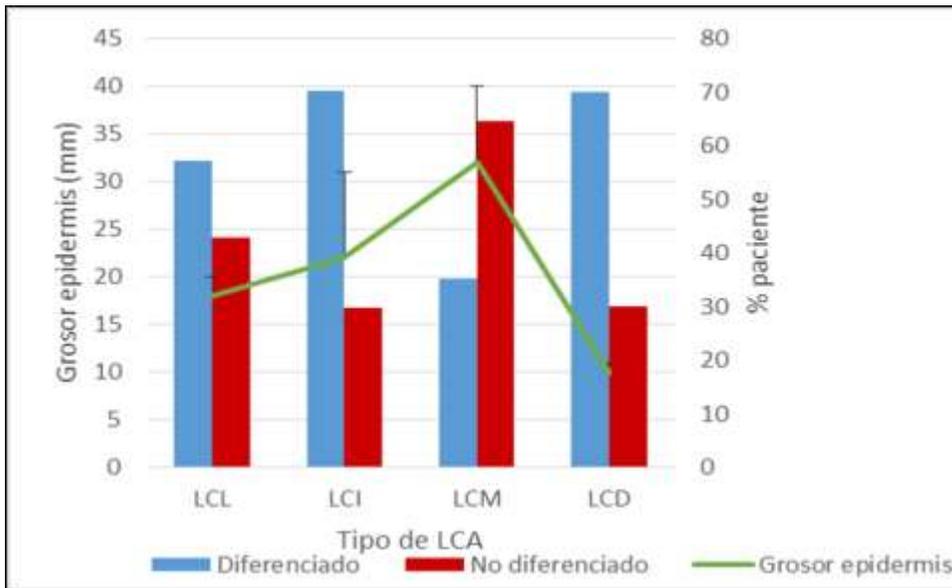
Sin diferencias significativas

C.- Área de infiltrado y número de granulomas



Sin diferencias significativas

D.- Grosor de epidermis y grado de diferenciación del granuloma



Sin diferencias significativas

E.- Área de infiltrado y grado de diferenciación del granuloma

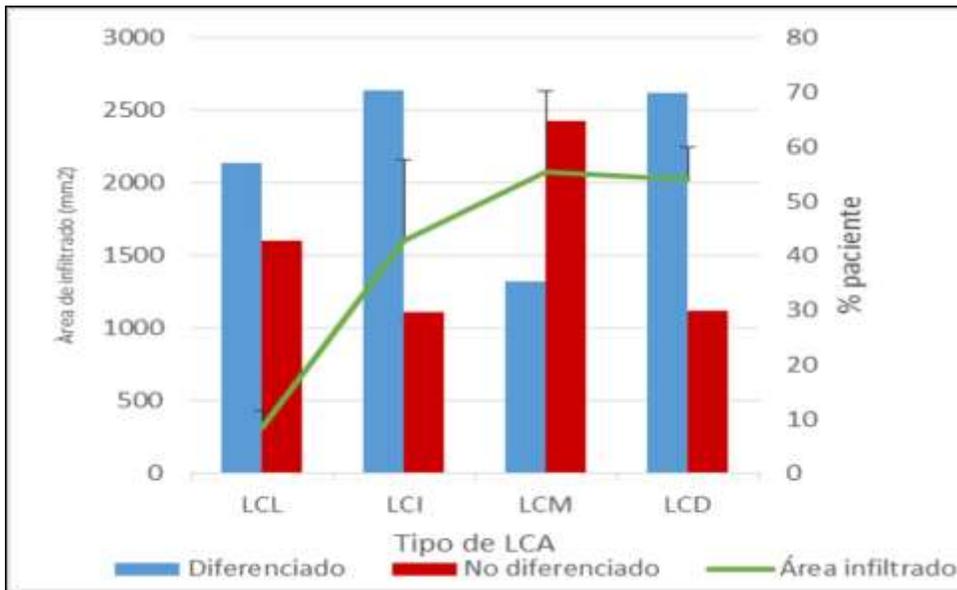


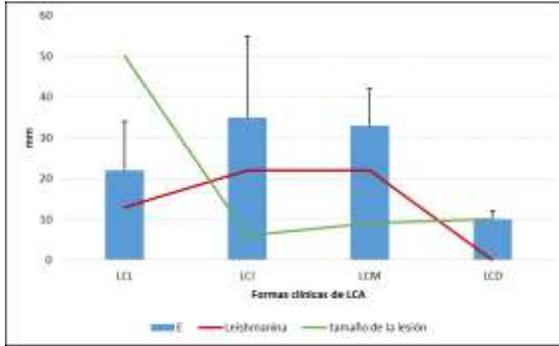
Tabla 11. Relación entre número y tamaño de las lesiones, leishmanina, número de granulomas, área de infiltrado (AI) y número de vasos con las formas clínicas de LC

Variable promedio	Tipo de Leishmaniasis			
	LCL	LCI	LCM	LCD
Número de lesiones	1,6	3	1,14	50,08
Tamaño de las lesiones (mm)	28,28	21,8	10,57	13,71
Leishmanina (mm)	15,86	13,6	20,71	13,71
(E) (mm)	17,64	21,79	32,28	10,30
Número de granulomas	4	7,4	2,43	4,29
AI (mm ²)	314,06	9,93	2079,22	2028,43

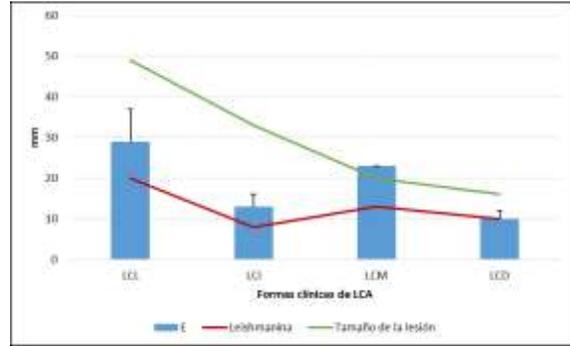
Gráfico 6. Evaluación morfométrica de las formas activas de LCA y su relación con el grado de diferenciación del granuloma y parámetros clínicos

A.- Grosor de Epidermis, leishmanina y tamaño de la lesión en granuloma diferenciado vs no diferenciado

Granuloma diferenciado

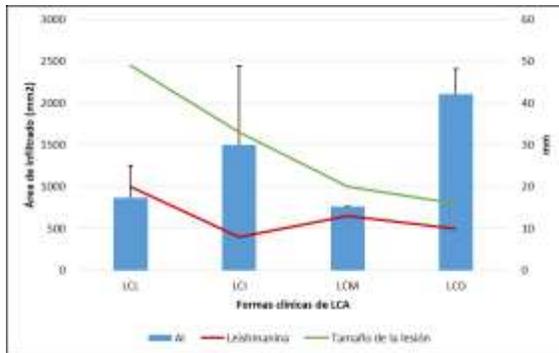


Granuloma no diferenciado



B.- Área de Infiltrado, leishmanina y tamaño de la lesión

Granuloma diferenciado



Granuloma no diferenciado

