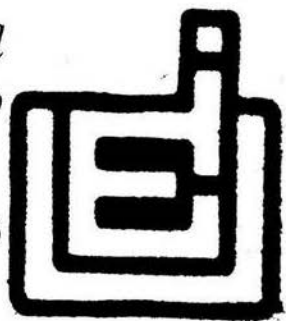




Universidad Nacional
Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE
ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA



“ CARACTERIZACION BIOLOGICA DE TRES
ESPECIES DE LEISHMANIA EN HAMSTER DORADO ”

T E S I S

Para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

MARGARITA VARGAS OLMOS

Los Reyes Iztacala, Edo. Méx. 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO :

- BIOL. MA. DE LOS ANGELES SANABRIA ESPINOZA
- BIOL. JOSE DEL CARMEN BENITEZ FLORES
- DR. OSCAR VELASCO CASTREJON
- BIOL. RODOLFO CARDENAS REYGADAS
- DRA. JOSEFINA TORRES GOMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA :

- LABORATORIO DE TRIPANOSOMATIDOS DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DEL INDRE
- LABORATORIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DEL INDRE

ASESOR DEL TEMA

DR. OSCAR VELASCO CASTREJO: _____

SUSTENTANTE

MARGARITA VARGAS OLMOS: _____

A MIS PADRES

GUADALUPE OLMOS GOMEZ

JOAQUIN VARGAS GARCIA

CON PROFUNDO AMOR Y RESPETO POR TODO EL CARIÑO, COMPRENSION Y APOYO QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO.

A MIS HERMANOS

**MIRNA
YOLANDA Y JOSE
ENRIQUE Y LILIA**

POR SU AYUDA INCONDICIONAL.

A MIS SOBRINOS

**MIGUEL
GUSTAVO
OSVALDO
ENRIQUE III**

**COMO UN MODESTO EJEMPLO PARA QUE ELLOS
LOGREN REALIZARSE EN LA VIDA.**

A MI ASESOR DE TESIS

DR. OSCAR VELASCO CASTREJON

POR SU APOYO A LA ELABORACION DE ESTA TESIS

A LA Q.F.B. CARMEN GUZMAN BRACHO

POR SU ENTUSIASMO, SU VALIOSA AYUDA Y POR SU AMISTAD

**AL DR. JORGE R. LOPEZ LOPEZ
MARTINA VEGA
JOSE LUIS MONROY CORTES**

POR SU VALIOSA Y DESINTERESADA COLABORACION.

**AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
DEL INDRE**

POR LA AMISTAD QUE SIEMPRE ME BRINDARON

A MIS PROFESORES

CON GRATITUD Y RESPETO

AL HONORABLE JURADO

GRACIAS POR SU COLABORACION Y SUS ACERTADAS OPINIONES

**AL PERSONAL ADMINISTRATIVO
COORDINACION DE BIOLOGIA
DE LA ENEP IZTACALA**

CON AFECTO

**CON ATENCION ESPECIAL A LA
LIC. AMERICA LANDA ROMERO**

POR SU APOYO

A MIS AMIGOS

**DULCE, JOEL, CESAR, LUIS, JOSE,
TONY Y ADRIANA Y DEMAS COMPAÑEROS**

**A JAVIER
POR SU INVALUABLE APOYO MORAL GRACIAS.**

**A PILAR, THELMA, NORMA, MARY CARMEN Y SILVIA
CON CARÍÑO.**

**A JUAN ANTONIO Y AL PERSONAL DEL BIOTERIO,
MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO.**

A LAZARO Y GABY

**A TODOS POR LA SINCERA AMISTAD QUE ME HAN BRINDADO Y POR LOS
MOMENTOS INOLVIDABLES QUE HEMOS VIVIDO.**

INDICE

I. Resumen

I. Introducción

II. Agente etiológico

- Clasificación
- Ciclo biológico
- Morfología
- Transmisión
- Reservorios
- Agentes fisicoquímicos

III. Distribución geográfica

IV. Formas clínicas

V. Patología

VI. Relación huésped-parásito

VII. Antecedentes

VIII. Justificación

IX. Objetivos

X. Metodología

XI. Resultados

XII. Análisis de resultados

XIII. Conclusiones

XIV. Discusión

XV. Anexos

XVI. Referencias bibliográficas

RESUMEN.

CARACTERIZACION BIOLOGICA DE TRES ESPECIES DE *LEISHMANIA* EN HAMSTER DORADO, MARGARITA VARGAS OLMOS.

Se han desarrollado algunos modelos animales en leishmaniasis experimental tanto visceral como tegumentaria con la intención de reproducir la enfermedad tal como ocurre en el hombre, siendo de un valor considerable en las diferentes disciplinas.

En el presente trabajo se plantea la utilización del hámster dorado como modelo experimental para las leishmaniasis, dado que, a la fecha, en México éste ha sido utilizado de manera general para aislamiento de cepas.

Se realizó un estudio comparativo en la inoculación a hámster dorados de tres especies del género leishmania: *L. donovani chagasi*, *L. mexicana mexicana* y *L. v. braziliensis braziliensis* por vía subcutánea con 2.5×10^6 amastigotes/ml formando tres lotes con seis hámsters cada uno y dos organismos testigos, realizando evaluaciones semanales de los cambios macroscópicos que pudieran encontrarse en el tegumento de los animales así como su estado de salud general tomando mayor atención al adelgazamiento, alopecia, posibles lesiones, forma y aspecto de éstas. A la sexta semana de incubación se sacrificó un organismo de cada lote con uno de los testigos y periódicamente cada dos semanas se siguieron sacrificando uno de cada lote. La infección experimental duro 16 semanas y en la última semana se sacrifico el segundo testigo.

Se obtuvieron muestras de bazo, hígado, colon, riñón, médula ósea, lesiones cutáneas, nariz y piel sana; se les realizó la técnica de rutina de histopatología para incluirlas en parafina, una vez obtenidos los cortes se tiñeron con HE, en los casos en los que el resultado era dudoso se empleo la técnica policrómica de Whipph modificada.

Se concluye que al inocular hámsters dorados por vía subcutánea con las diferentes especies de leishmania se desarrollan lesiones no ulcerativas de evolución progresiva con invasividad temprana a vísceras.

Por lo que se considera al hámster dorado como un buen modelo experimental a la leishmaniasis, por ser susceptible a las tres especies trabajadas

INTRODUCCION

Las leishmaniasis son zoonosis originadas por protozoarios parásitos intracelulares obligados del género Leishmania pertenecientes a la familia de los tripanosomátidos. Se transmiten por la picadura de pequeños dípteros de la familia Psicodidae a humanos y mamíferos domésticos y silvestres. Estos hemoflagelados infectan el Sistema Retículo Endotelial (SRE) manifestandose, de manera general, en el hombre de dos formas clínicas diferentes: la visceral y la tegumentaria quienes, a su vez presentan diversas particularidades.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a las Leishmaniasis dentro de las 6 Enfermedades Tropicales Mayores (OMS,1984) ya que estos padecimientos ocasionan grandes problemas de salud pública, no solo por causar lesiones físicas sino que involucra, además graves consecuencias socioeconómicas y psicológicas (OMS,1979).

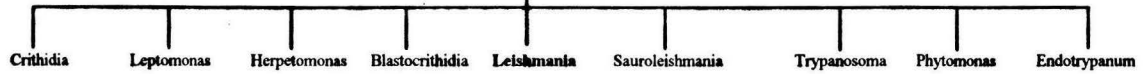
Un hecho importante es que las leishmaniasis pueden alejar al turismo en zonas de endemia, como sucede en el Sureste mexicano y en regiones turísticas latinoamericanas (Walton, 1987).

Debido a la transformación de los ecosistemas naturales a antroposistemas, la cantidad de animales que sirven como reservorios silvestres se disminuye y por ende en estas regiones, el hombre se ha convertido en fuente de alimento para el mosquito transmisor (Velasco,1987).

Familia

TRYPANOSOMATIDAE

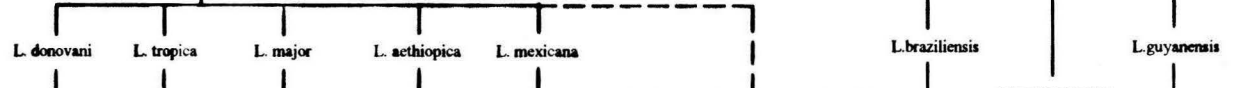
Género



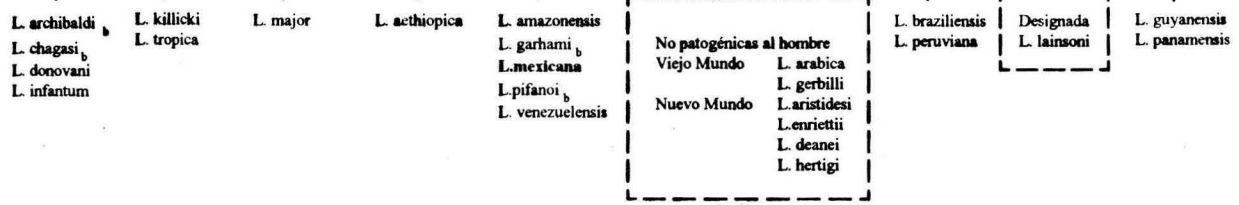
Subgénero



Complejo



Especie



10

a La clasificación del género y subgénero es basado en caracteres extrínsecos, y los complejos, principalmente a los caracteres intrínsecos (isoenzimas).
 b Algunos investigadores no consideran a estas especies separadas

CUADRO 1
Taxonomía de las Leishmanias

AGENTE ETIOLOGICO

Clasificación (Kudo, 1986):

REINO: Protista Eucarionte, sistema genético mendeliano, recombinación obligada en cada generación, fagocitosis y movilidad.

PHYLUM: Protozoa Unicelulares, funciones y estructura de las célula animal.

SUBPHYLUM: Plasmodroma Con pseudópodos o flagelos, estructura sencilla, único tipo de núcleo. reproducción asexual por fisión binaria longitudinal.

CLASE: Mastigophora Uno a varios flagelos. Nutrición holozoíca, endoparásitos.

SUBCLASE: Zoomastigia Sin cromatóforos. Un solo núcleo de estructura vesicular. Organelos característicos tales como el cuerpo parabasal y el axostilo.

ORDEN: Protomomadida Uno a dos flagelos, la mayoría parásitos sin membrana exterior definida.

FAMILIA: Tripanosomatidae Cuerpo característicos semejante a una hoja, un solo núcleo y blefaroplasto del cual se origina un flagelo que forma el margen exterior de la membrana ondulante, la cual se extiende a lo largo de un lado del cuerpo. Todos parásitos.

GENERO: *Leishmania* En el huésped vertebrado la forma es ovoide, con un núcleo y blefaroplasto, 2-5 μ de diámetro, vacuolas, parásitos intracelulares del sistema retículo endotelial, parasitan en el intestino de insectos succionadores de sangre, el organismo se desarrolla transformándose en forma de promastigote. (Kudo, 1986).

Desde 1974, Lainson y Shaw publicaron un estudio sobre las leishmaniasis en el hemisferio occidental, agrupando las diversas especies de leishmanias en "complejos", haciendo desaparecer como único factor taxonómico el cuadro clínico causado en el humano y basándose en otros tan diversos como el comportamiento del parásito en los vectores, en su habitat dentro de ellos, así como su conducta en el medio de cultivo NNN y el estudio comparativo de la densidad flotante del ADN en dicho medio (Lainson, 1974; Bonfante-Garrido 1983).

Según estos criterios, en América existen los complejos *L. mexicana*, *L. braziliensis* como causantes de leishmaniasis tegumentarias y el complejo *L. donovani* para organismos causantes de la leishmaniasis visceral.

Los representantes de estos complejos detectados en nuestro país son:

L. ((viannia)) braziliensis braziliensis ocasionando leishmaniasis cutánea localizada (LCL) (Velasco, 1989).

L. mexicana mexicana ocasiona leishmaniasis cutánea localizada y diseminada (LCD) y la forma mucocutánea (LMC) (Walton, 1986; Velasco, 1989).

Leishmania donovani chagasi causante de la leishmaniasis visceral o Kala-azar (LV).

El género *Leishmania* es dividida en dos subgéneros basados en el desarrollo en el mosquito. El crecimiento de especies del subgénero *Leishmania* es restringido a las partes del tracto digestivo en los vectores naturales. Los que se desarrollan entre el píloro y la parte posterior del intestino medio se les llama suprapylaria. En cuanto a las especies del subgénero *Viannia* ocurre en ambos en el intestino medio y el posterior, y se les llama peripilaria (Cuadro 1).

Dentro del subgénero la identificación presuntiva es basada en las características extrínsecas por ejemplo manifestaciones clínicas y características en cultivo; pero la identificación definitiva de los niveles de especie es usualmente hecha por métodos bioquímicos comparándolos con cepas de referencia establecidas.

En la identificación infraespecífica los métodos usados son: serodemos, zimodemos, esquizodemos; dando resultados de uso práctico en la epidemiología descriptiva, permitiendo el agrupar los parásitos dentro de sus jerarquías, sugiriendo así las relaciones evolutivas. (OMS, 1990)

CICLO BIOLÓGICO.

1. Morfología.

Las leishmanias se presentan bajo dos formas diferentes, una móvil y flagelada: promastigote y la otra inmóvil intracelular no flagelada, amastigote (fig. 1).

En el hombre y en los mamíferos infestados, los parásitos están bajo la forma de amastigote.

Estas leishmanias están en las células histiocitarias. Son células ovoides de 2 a 6 μ , provistas de un núcleo con cariosoma central y un blefaroplasto que representa el aparato flagelar. La coloración de Giemsa tiñe el citoplasma de color azul y el núcleo y el blefaroplasto de rojo, en el vector (flebotomo) y en el cultivo, las leishmanias se presentan en forma de promastigote, libres, alargadas y móviles gracias a un flagelo anterior (Lainson 1982, Beltrán 1942).

2. Vectores.

Las leishmanias son transmitidas por la picadura de los flebotomos, pequeñas moscas de 2 a 3 mm con el cuerpo y las alas cubiertas de sedas (fig.2). Abundan todo el año en la zona tropical, y el verano en zona templada. Se localizan en las pendientes andinas hasta 2000 msnm. Existen más de 600 especies o subespecies en el mundo, de las cuales menos de 50 han sido implicadas en la transmisión de las leishmanias.

Se reconocen 5 géneros de flebotomos: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Warileya* y *Brumptomyia*. Dos de ellas solamente son reconocidas como vectores de la leishmaniasis: en el viejo mundo, el género *Phlebotomus* y en el nuevo mundo el género *Lutzomyia*. Existe duda respecto al género *Warileya* (cuadro 1).

El género *Lutzomyia* tiene dos subgéneros vectores de la enfermedad: *Nissomyia* y *Psychodopygus* con varias especies. *Lutzomyia longipalpis* es el vector de la leishmaniasis visceral en toda la América del sur (Marzochi et al 1983, Coutinho et al 1983, Trementano, 1983). Las otras especies transmiten las formas mucocutánea y cutáneas (Lainson 1982).

En México solo se ha comprobado la transmisión de leishmania por *Lutzomyia*. (*Nissomyia olmeca* el cual es predominantemente antropofílico. (Biagi 1965, Disney 1968). Por otro lado, se cree que *Lutzomyia longipalpis* puede ser la transmisora del Kala-azar en la Cuenca del Balsas, *Lutzomyia diabolica* transmisora de las formas cutáneas en el norte del país y *Lutzomyia cruciata* vector de la leishmaniasis en Oaxaca y la Chontalpa Tabasqueña (Díaz-Najera 1971, Ibáñez-Bernal 1991, Velasco-Castrejón et al 1991) (cuadro 2). (Velasco-Castrejón 1991).

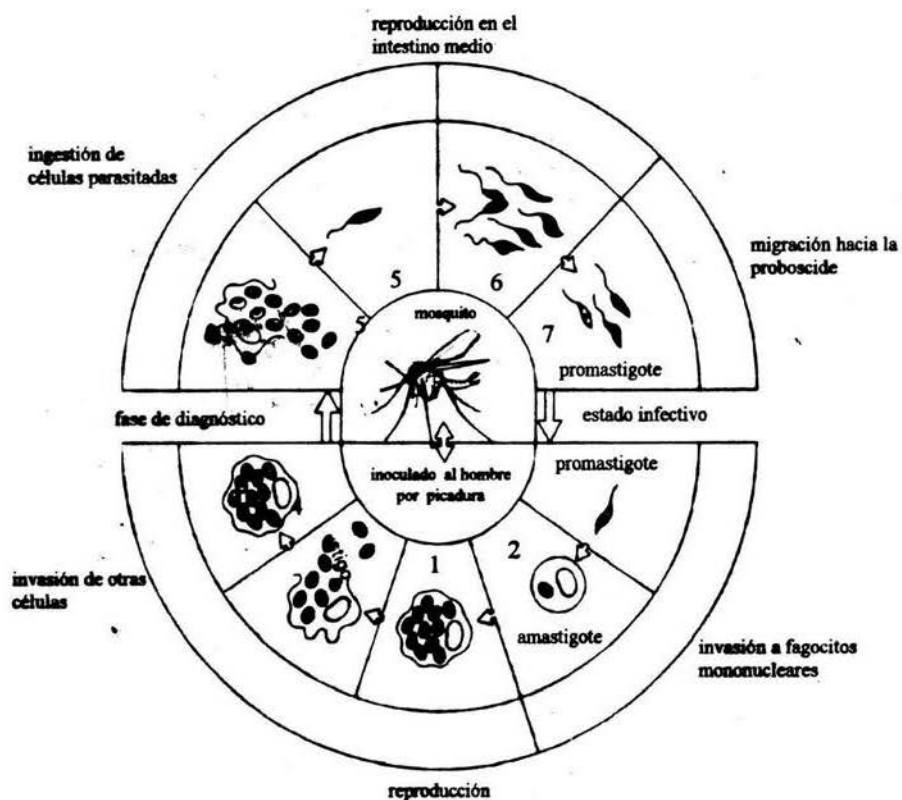


FIGURA 1 Ciclo de vida de las Leishmanias

Se muestra un diagrama esquemático del ciclo vital de la leishmania. En el ser humano, la infección comienza cuando el promastigote es inyectado en la piel (1). De esta forma penetra en el fagocito mononuclear (2), se convierte en amastigote y se multiplica (3). Se liberan más amastigotes que infectan otras células (4). Durante su paso por la sangre, las células infectadas pueden ser captadas por el vector al alimentarse. Después de la transformación en la forma promastigote (5) tiene lugar la reproducción en el intestino medio del insecto (6). Desde allí los promastigotes migran hacia la proboscide (7) para completar el ciclo.

ESPECIE	TIPO DE LEISHMANIASIS	REGION
<i>Lutzomyia olmeca</i> *	Cutánea	Península de Yucatán
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Kala-azar	Cuenca de Balsas
<i>Lutzomyia cruziata</i>	Cutánea	Oaxaca
<i>Lutzomyia diabolica</i>	Cutánea	Noroeste de México

* UNICO VECTOR COMPROBADO

CUADRO 2

LUTZOMYIAS MEXICANAS IDENTIFICADAS

GENERO	SUBGENERO	ESPECIE	PARASITO TRANSMITIDO
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>verrucanum</i> <i>peruana</i> <i>nuñez-tovari</i> <i>ssp anglesi</i> <i>longipalpis</i>	<i>L. peruviana</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. chagasi (o infantum)</i>
	<i>Nyssomyia</i>	<i>flaviscutellata</i> <i>olmeca</i> <i>trapidoi</i> <i>ylephicator</i> <i>umbratilis</i>	<i>L. mexicana amazonensis</i> <i>L. mexicana mexicana</i> <i>L. braziliensis panamensis</i> <i>L. braziliensis panamensis</i> <i>L. braziliensis guyanensis</i>
<i>Psychodopygus</i>	<i>Psychodopygus</i>	<i>wellcomei</i> <i>yucumensis</i> <i>llanomartinsi</i>	<i>L. braziliensis braziliensis</i>

CUADRO 2A Flebotomos vectores de la Leishmaniasis humana en América Latina

3. Transmisión del parásito por los flebotomos.

Es en el momento de la ingestión de sangre de un animal o del hombre infectado, cuando el flebotomo absorbe al parásito. Las leishmanias amastigotas se transforman en el intestino del flebotomo en promastigotes y se multiplican, llegando enseguida a las partes bucales. La duración del ciclo en el flebotomo es de 4 a 7 días según la temperatura ambiente. Así, el mosco puede ahora transmitir el parásito a otro animal o al hombre.

Los flebotomos infectados tienen dificultad de absorber su alimento sanguíneo, lo cual puede ser un factor de multiplicación de las picaduras y entonces un factor de aumento de la transmisión. Esta es limitada por la cantidad intrínseca de cada especie, por su antropofilia y por su esperanza de vida (Biagi 1965).

4. Reservorios.

Los reservorios de las leishmanias son animales domésticos como el perro, o los animales salvajes (p.e. marsupiales y roedores) (Cuadro 4). En una región dada una especie de leishmania es fácilmente mantenida por un solo huésped reservorio, sin importar si otros mamíferos pueden ocasionalmente encontrarse infestados. Los animales salvajes no presentan generalmente los síntomas clínicos viscerales.

El perro al contrario muere de leishmaniasis visceral en un plazo de 6 meses a dos años. (Velasco, 1989; Kirmse, 1978).

En México se han encontrado los siguientes reservorios para *L. mexicana*: *Ototylomis*, *Heteromys*, *Nyctomys* y *Sigmodon* (Lainson 1982). Se aisló de un tejón (*Nassua narica*) una leishmania que por su comportamiento en cultivo y la resistencia al tratamiento con antimoniales hace sospechar de una infección por *L. braziliensis*, también se ha confirmado la presencia del parásito en el perro (*Canis familiaris*) en el estado de Oaxaca (Cuadro 5).

5. Acción de los agentes fisicoquímicos.

Las leishmanias en los cultivos se desarrollan a una temperatura comprendida entre los 16°C y 28°C siendo la óptima de 22°C, pueden mantenerse vivas hasta las temperaturas extremas de 5°C y 44°C por tiempos cortos. La luz solar parece no dañarlas, en cambio la luz ultravioleta después de una exposición de 40 minutos, es mortal. La solución de carbonato de sodio al 1% y el ácido clorhídrico al 0.5% matan a las leishmanias en cultivo.

PARASITOS	RESERVORIO ANIMAL	FORMAS CLINICAS
<i>L. chagasi</i> / <i>L. infantum</i>	Perros Cánidos salvajes	VISCERAL LEISHMANIASIS
<i>L. braziliensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. peruviana</i>	Paca (roedor), perro Oso hormiguero, perezosos, roedores Perezosos, monos Roedores, marsupiales Perros	LEISHMANIASIS CUTANEA -Espundia -Pian Bosque -Leishmaniasis cutáneas -Ulcera de los chicleros -Formas cutáneas difusas -Formas cutáneas difusas -Uta

CUADRO 4 Principales reservorios animales y formas clínicas de las Leishmaniasis en América Latina (Brooke, 1984)

ANIMAL	LOCALIZACION
Roedores	Bélice y posiblemente Península de Yucatán
Perro doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	Xalahui, Oax. (Velasco)
Tejón (<i>Nassua narica</i>)	Chiapas (Velasco y Lebrija)

CUADRO 5

POSIBLES RESERVORIOS DE LEISHMANIASIS CUTANEAS EN MEXICO

DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

Es difícil delinear con exactitud la actual distribución de las leishmaniasis y determinar su prevalencia en el hombre, ya que cambios ecológicos o de otra índole puedan eliminar la enfermedad en algunos focos muy endémicos o a la inversa, acrecentar su prevalencia en otros.

Las leishmaniasis tegumentarias son de distribución cosmopolita, a excepción de Australia. En Africa se encuentra el botón de oriente en la región norte. Así como en Africa occidental, ecuatorial, Nigeria y Egipto, en Asia desde el sureste de la URSS, la Península del Indostán y Medio Oriente. En Europa se distribuye en las costas e islas del Mediterráneo (España, Italia, Grecia, Bulgaria, Rumania así como un pequeño foco en Francia (Bray 1972). En América las leishmaniasis tegumentarias se distribuyen desde el sur desde los E.U.A. (Shaw-Wuigg 1976) hasta el norte de Argentina y Paraguay a excepción de Chile y Uruguay (Walton 1987).

Respecto al Kala-azar, éste se distribuye en la cuenca del Mediterráneo en Africa, algunas regiones de Asia y en pequeños focos en México (Báez-Villaseñor 1952), Guatemala, El Salvador, Colombia, Venezuela y Paraguay. En Brazil, principalmente en la región noreste, constituye un verdadero problema en salud pública (Zajtchuk 1989)(Fig.3).

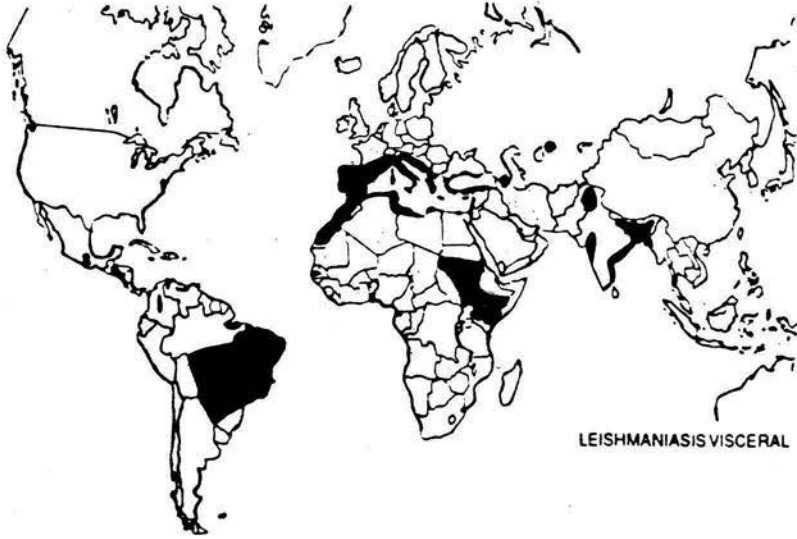
En América coexisten complejos de leishmania que causan enfermedades al hombre *L. mexicana* y *L. braziliensis*, así como *L. peruviana* que aunque encajada en el complejo braziliensis es considerada independiente, más que nada en base a su singular epidemiología, ya que es el único agente etiológico de leishmaniasis en el hemisferio occidental, no relacionado con la selva, ni con reservorios silvestres, de los cuales nunca se han aislado los parásitos. *L. peruviana* causa la "uta" que ocurre en las áridas vertientes de los andes peruanos y en las mesetas argentinas (Walton 1987). Recientemente se ha descrito una nueva especie de leishmania: *L. m. garhnamii* en los Andes venezolanos, que ecológicamente se parece a la anterior (Scorza 1979).

En México existen todas las formas clínicas de las leishmaniasis: la forma visceral (Velasco 1987), la leishmaniasis mucocutánea o espundia (Velasco 1990) y las leishmaniasis tegumentarias (úlceras de los chicleros o leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) y leishmaniasis cutánea esporotriciforme).

Las leishmaniasis tegumentarias se distribuyen desde la franja fronteriza de Coahuila y Tamaulipas con los Estados Unidos (Shaw 1976, Walton 1987), hasta la frontera de Guatemala y Belice afectando al menos 15 entidades federativas: Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche,

Figura # 3

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS LEISHMANIASIS



LEISHMANIASIS VISCERAL



LEISHMANIASIS SCUTANEAS

Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Morelos, Michoacán, Jalisco, y Nayarit. (Velasco, 1987)(Fig.4).

La *espundia* solo se ha encontrado circunscrita a Tabasco (2 casos) y a la región limítrofe veracruzana (un caso) Chiapas y Oaxaca (Velasco 1989) lo que parece sugerir que en estas zonas se dan condiciones ecológicas particulares que le permiten su establecimiento.

Estas características ecológicas favorables para el desarrollo de las diversas formas clínicas de leishmaniasis tegumentarias parecen derivar de la destrucción de la primitiva vegetación: selva perennifolia y pastizales, por la sustitución a una selva doméstica.

Respecto al Kala-azar o leishmaniasis visceral se distribuye desde la cuenca del Río Balsas comprendiendo porciones de Puebla, Guerrero, Morelos, Oaxaca y Michoacán. (Velasco 1984 Aguirre 1963), en la actualidad se han encontrado 2 casos en el Norte de Chiapas (Velasco; por publicar).

FORMAS CLINICAS.

La leishmaniasis visceral es causada por *L. donovani* y sus subespecies. Puede ser endémica, esporádica o epidémica. Las manifestaciones clínicas suelen diferir según se trate de una u otra de estas tres situaciones (cuadro 6).

En la leishmaniasis mucocutánea las lesiones primarias pueden ser semejantes a LC de otros países con propagación metastásica a la mucosa oronasal-faríngea durante la presencia de la lesión primaria o hasta treinta años después. La ulceración y la erosión destruyen progresivamente el tejido blando y el cartilago de la mucosa oronasal faríngea hinchándose la nariz y los labios hasta adquirir en ocasiones el aspecto de "nariz de tapir". Este proceso puede ser doloroso o indoloro; es frecuente la infección secundaria. A diferencia de la LC las lesiones no curan espontáneamente, son destructivas y llegan a alterar la fonación y la deglución. El sufrimiento y la mutilación son notables y la muerte se produce por bronconeumonía o mal nutrición. El tratamiento específico presenta resistencia.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea suele diferir según las regiones e incluso en una misma región, dependiendo de las diferentes especies de parásitos o del ciclo zoonótico y también quizá de la respuesta del paciente determinada por factores genéticos (cuadros 7 y 8). En México se presentan la forma localizada la diseminada y una manifestación intermedia denominada esporotriciforme:

La leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros se caracteriza habitualmente por una ulceración pequeña y única, aunque puede ser grande y múltiple. La ulceración es generalmente redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e indolora y aparece aproximadamente 15 o 20 días después de la picadura infectante. Al principio es un pequeño nódulo, pruriginoso, que evoluciona hacia la ulceración, aunque algunas veces la lesión continua siempre nodular y se transforma en una placa infiltrada o atrófica e inclusive se vuelve vegetante. La LCL tiende a la curación espontánea en 6 meses a 2 años, excepto cuando se localiza en orejas, donde es crónica y mutilante o si es causada por *L. braziliensis* que origina úlceras muy persistentes y más resistentes al tratamiento con antimoniales.

Leishmaniasis cutánea diseminada. Puede iniciarse con nódulos no ulcerativos distribuidos a lo largo de vía linfática simulando una esporotricosis. Invade lentamente todo el tegumento con excepción de regiones pilosas, genitales palmas de las manos y plantas de los pies, invade también mucosas orofaríngea y nasal. Se presenta anergia específica.

Formas clínicas de la Leishmaniasis visceral (L.V.)			
Forma clínica	Especie	Distribución	Características
Leishmaniasis Visceral Endémica (L.V.E.)	<u>L. donovani</u>	Mediterráneo, Asia Sudoriental, China y América	Afecta niños; incuba de días a más de un año. Fiebre, pérdida de peso, anorexia, molestias en el hipocondrio izquierdo, esplenomegalia, linfadenopatía, oscurecimiento en algunas regiones de la piel.
Leishmaniasis Visceral Esporádica (L.V.E. ³)	<u>L. donovani</u>	Personas no nativas	Incuba entre 3 semanas y 2 años después; fiebre, pérdida de peso rápido, puede traer complicaciones raras como anemias muy agudas.
Leishmaniasis Visceral Epidémica (L.V.E. ⁴)	<u>L. donovani</u>	Son susceptibles todas las edades.	Oscurecimiento de cara, manos, pies y abdomen, fiebre, edemas y demás síntomas de la L.V.E.
Leishmaniasis Dérmica o Poskala-azar	<u>L. donovani</u>	Subcontinente Indio	Se manifiesta varios años después de curada la L.V. Infiltraciones crónicas múltiples en la piel sin ulceraciones.

CUADRO 6 (OMS,1984)

Leishmaniasis cutánea del viejo mundo (L.C.V.M.)

FORMA CLINICA	ESPECIE	DISTRIBUCION	CARACTERISTICAS PRINCIPALES
Botón de Oriente	<u>L. tropica</u> <u>L. mayor</u> <u>L. aethiopica</u> <u>L. donovani</u>	África y cuenca del Mediterráneo	Lesión clásica comienza en forma de nódulo en el lugar de inoculación en el centro se forma costra que al desprenderse deja úlcera que cura gradualmente dejando cicatriz hundida con pigmento alterado; nódulos secundarios en el borde de la lesión.
Leishmaniasis recurrente	<u>L. tropica</u>	Etiopia, Kenia	Lesión de progresión lenta y desfigurante generalmente en la cara característica por cicatriz con actividad periférica.
Leishmaniasis Cutánea Antroponótica o Urbana	<u>L. tropica</u>		Ulceración indolora de la piel con frecuentes cicatrices desfigurantes. Las úlceras secas suelen curar en un año o más; incubación de 2 a 8 meses.
Leishmaniasis Cutánea, Zoonótica o Rural	<u>L. mayor</u>		Incuban en menos de 4 meses con lesiones indoloras que a menudo se inflaman y ulceran, con frecuencia las lesiones son múltiples.
Leishmaniasis Cutánea	<u>L. aethiopica</u>	Etiopia	3 tipos de lesiones: Furúnculo oriental <u>L. mucocutánea</u> <u>L. difusa</u> Úlceras de evolución lenta cura de 1 a 3 años.
Leishmaniasis Mucocutánea	<u>L. aethiopica</u> <u>L. donovani</u>	Sudán Etiopia	Evolución lenta en ulceración de mucosa bucal. La lesión primaria se manifiesta como L.M.C.

CUADRO 7 (OMS,1984)

PATOLOGIA.

En el hombre la leishmania se presenta en forma de parásitos intracelulares denominados amastigotes (figura 1), que se multiplican en macrófagos y otros fagocitos del sistema retículo endotelial. Aunque se han observado diversas manifestaciones de las infecciones producidas por leishmania, todas las variedades clínicas y geográficas de la enfermedad tienen una característica histológica común: la acumulación temprana de células fagocíticas mononucleares (o hiperplasia) en los tejidos invadidos (Zajtchuk, 1989).

Las especies dermatrópicas producen un histiocitoma inicial en la piel mientras que en las especies viscerotrópicas inducen hiperplasia de las células reticuloendoteliales en los órganos afectados. Las alteraciones patológicas que caracterizan las diversas formas clínicas de la enfermedad reflejan el equilibrio entre la multiplicación de los parásitos, los cambios degenerativos resultantes y la respuesta inmunitaria del paciente.

En el siguiente cuadro se observan las diferencias patológicas entre las diversas formas clínicas.

FORMA CLINICA	PATOLOGIA
Leishmaniasis Visceral	Hiperplasia reticuloendotelial, afecta bazo, hígado, mucosa del intestino delgado, médula ósea y nódulos linfáticos; ocasionando atrofas en zonas paracorticales; granulocitopenia y anemia. En fase avanzada son frecuentes infecciones oportunistas como neumonias y disenterías.
Leishmaniasis Dermica Poskala-azar	Infiltración histiocítica, edema. proliferación de capilares y numerosos parásitos en las formas eritematosas.
Leishmaniasis Cutánea sin complicaciones	Respuesta celular inmunitaria. Macrófagos parasitados, algunos vacuolados. Aumento progresivo del infiltrado de linfocitos y plasmocitos en el transcurso de la enfermedad. Respuesta hística. Durante la destrucción de parásitos se dan los siguientes sucesos: edema en la dermis, fibrosis, necrosis de colageno, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, puede ocasionar vasculitis.
Leishmaniasis Cutánea Diseminada	Ausencia de inmunidad celular y gran cantidad de macrófagos parasitados sin necrosis ni ulceración. En caso de recaída postratamiento presenta hipersensibilidad celular adquirida.
Leishmaniasis Recurrente	Infiltrado linfocítico abundante, necrosis fibrinoide poco frecuente, no caseinifica pocos parásitos en las lesiones.
Leishmaniasis Mucocutánea del Nuevo Mundo	Macrófagos con escasos parásitos. Infiltración celular inespecífica asociada a ulceraciones inducidas sin necrosis de macrófagos. Lesiones inician en piel seguidas de afectaciones a mucosas. Puede haber necrosis de colageno con alteración fibrinoide y vasculitis. Mucosa nasal profunda con amastigotes en epitelio vascular proliferante, asociados con abundante infiltrado celular perivascular y licuefacción de cartilago.

CUADRO 8

PATOLOGIA DE LAS LEISHMANIASIS

RELACION HUESPED/PARASITO.

Se dispone de escasa información acerca de la relación huésped parásito en el hombre. Poco se sabe del proceso que sigue a la inoculación de promastigotes, el cual tal vez sea de suma importancia para el resultado final de la infección.

Dentro de los macrófagos huésped, los amastigotes están protegidos contra los anticuerpos y cualesquiera sustancias circulantes que podrían dañar al parásito. La supervivencia del parásito en el huésped tiene que depender, por tanto de la capacidad del microorganismo para incorporarse a esas células (Monroy, 1986). Sin embargo, la búsqueda de un organelo específico que facilitará la invasión activa de las células ha resultado hasta ahora infructuosa, siendo probable que leishmania sea asimilada por simple fagocitosis. Se ha demostrado la unión de fagosomas que contienen parásitos con lisosomas. Este fenómeno no parece dañar a los parásitos que se multiplican en los fagolisosomas. La fagocitosis *in vitro* de leishmania en macrófagos incrementa la absorción de oxígeno y genera metabolitos tóxicos del oxígeno, con el peróxido de hidrógeno. Los promastigotes son sensibles a esos compuestos y se supone que *in vitro* son destruidos por esos metabolitos en los macrófagos.

La producción de compuestos tóxicos aumenta considerablemente en los macrófagos activados que son capaces, en condiciones especiales *in vitro*, de matar al parásito en su estadio de amastigote. Esta capacidad parasiticida parece ser no obstante, una predisposición genética del macrófago y depende además del tipo de parásito involucrado.

No se dispone de datos sobre resistencia genética ni susceptibilidad racial en el hombre, si bien se ha observado que la LCM produce síntomas diferentes en los amerindios y en pacientes de linaje africano. Sin embargo, la capacidad tan notable de *Leishmania* de persistir en personas inmunocompetentes y la capacidad de algunas especies de *Leishmania* de suprimir la respuesta inmunitaria hacen pensar que la relación con el hombre es muy antigua.

Casi nada se sabe de las características del parásito que determinan la infectividad, la virulencia el dermatotropismo o viscerotropismo y la capacidad de sobrevivir en el hombre, aunque es evidente que las diversas especies de *Leishmania* manifiestan estas características en grado diferente (OMS, 1984).

RESPUESTA INMUNITARIA

La Leishmaniasis humana induce respuestas inmunes humorales y celulares, pero el grado relativo en que se dan unas y otras varía con el tipo de enfermedad. En el siguiente cuadro se las principales características inmunológicas de las diversas infecciones de Leishmaniasis en el hombre (Cuadro 9).

Especie de Leishmania	Tipo de Enfermedad	Respuesta Inmunitaria			
		Hipersensibilidad cutánea diferida	Anticuerpos	Parásitos en lesiones	Tendencia a la curación espontánea
<i>L. tropica</i>	LC	presente	variables	presentes	si
	LR	intensa	variables	escasos	no
<i>L. major</i>	LC	presente	presentes	presentes	rápida
<i>L. aethiopica</i>	LC	débil	variables	presentes	lenta
	LCD	ausente	variables	abundantes	no
<i>L. donovani</i>	LV	ausente	abundantes	abundantes	infrecuente
	LDPK	variable	variables	variables	variable
	LC	presente	variables	presentes	si
<i>L. brasiliensis</i>	LC	presente	presentes	presentes	si
	LMC	presente	presentes	escasos	no
<i>L. mexicana</i>	LC	presente	variables	presentes	si
	LCD	presente	variables	abundantes	no

CUADRO 9 Principales características inmunológicas de las infecciones de Leishmaniasis en el hombre. (OMS, 1984)

LC: Leishmaniasis cutánea, LCD: Leishmaniasis cutánea difusa, LDPK: Leishmaniasis dérmica postkala-azar, LMC: Leishmaniasis mucocutánea, LR: Leishmaniasis recurrente, LV: Leishmaniasis visceral

ANTECEDENTES

A pocos años de haberse descubierto el agente causal del Kala-azar (Donovan 1903, Leishman 1904) se iniciaron infecciones experimentales en perros (Nicolle 1908) y en roedores (Laveran 1912, Row 1914). Durante los años 20's y 30's se realizaron amplios estudios en animales de laboratorio convencionales. Algunos años más tarde las publicaciones de Adler, Shortt y muchos otros permitieron entender la histopatología, epidemiología y la patogénesis de la leishmaniasis visceral. Por otro lado el descubrimiento de la infección natural en el cobayo, sumado a los animales de experimentación ya utilizados (Medina 1946) ha contribuido al conocimiento de como ocurre la enfermedad de manera general.

Durante los años 50's se establecen estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos donde la leishmaniasis representa una colección de enfermedades cuyo agente etiológico es un protozoo del género *Leishmania*, pero que difieren significativamente en su patogenia.

La única forma de leishmaniasis que no ha podido ser reproducida experimentalmente en animales es la forma mucocutánea.

Los trabajos de Adler, Stauber y Convit durante los 50's y los 60's ambos en el hombre y animales experimentales llevan a la siguiente hipótesis: que la severidad de la leishmaniasis está directamente relacionada a la respuesta inmune adquirida del huésped.

Leishmaniasis visceral.

Los modelos animales más utilizados en la actualidad son sin duda el hámster y el ratón infectados con *Leishmania donovani*.

Poco se ha escrito sobre el perro como modelo experimental en leishmaniasis. En 1987 Kirmse destaca la evolución sobre los signos de la leishmaniasis canina. En 1991, Abranches encuentra una gran respuesta humoral al antígeno de la leishmania visceral.

A cerca de los tlacuaches (*Didelphis marsupialis*) hay dos estudios sobre ellos como modelo animal, coincidiendo ambos en la gran susceptibilidad como hospedero de *Leishmania donovani* (Hanson, 1980; White M.R. 1989).

Los primates también han sido objeto de estudio como modelos experimentales en estas patologías y se ha encontrado, que solo los monos aulladores (*Aotus trivirgatus*) y los monos ardilla (*Saimiri sciurea*) son susceptibles a *Leishmania donovani* (Champan 1981, Denniss 1985, Broderson J. R. 1986.)

La infección de hámsters con *L. donovani* ha sido usada para demostrar las diferencias infectivas entre los promastigotes y los amastigotes, inoculados por la misma vía (Keithly 1976).

El trabajo de Stauber (1958) demostró que la vía de inoculación intravenosa con *Leishmania donovani* en hámster resultó fatal, infectando principalmente hígado bazo y médula ósea, a diferencia de la vía subcutánea que da una sobrevida de más de un año. Además se demostró la relación directa entre la dosis infectante y el tiempo de sobrevida.

Estudios recientes por Bradley y colaboradores, han demostrado diferencias significativas en la resistencia relativa a la infección con *L. donovani* en varias cepas de ratón (Bradley 1979, Blackwell 1980), demostrando que la resistencia natural a *L. donovani* está bajo el control de un gene que se encuentra lejos del complejo mayor de histocompatibilidad.

Leishmaniasis cutánea:

La mayor proporción de nuestros conocimientos sobre los mecanismos de defensa en el huésped a la infección experimental de leishmaniasis ha sido derivada de estudios sobre la forma cutánea.

Con raras excepciones han sido usados los hámsters (Belehu 1976) en leishmaniasis cutáneas experimentales, se ha involucrado la infección con ratón, con *L. tropica* o cobayo con *L. enriettii*

Los trabajos extensos de Bryceson y colaboradores (Bryceson 1970, Bryceson 1974 y Bryceson 1972) demostraron que la infección de cobayos con *L. enriettii* provee un modelo ideal para estudiar las relaciones en el curso clínico de la enfermedad y la respuesta inmunológica del huésped.

Aunque la mayoría de trabajos experimentales de leishmaniasis han sido elaborados en el modelo *Leishmania enriettii* en cobayos la enfermedad en otros roedores de experimentación también se han examinado.

Se ha demostrado que la respuesta inmune en ratón, depende de las células T como el resultado de una inmunidad adquirida (Alexander 1980). La enfermedad cutánea no cura progresivamente, esto ha sido asociado a la supresión de la inmunidad mediadora de células T (Arredondo 1979) este trabajo fué repetido usando cepas de *Leishmania mexicana*, sin embargo un reporte reciente sugiere que esta infección puede diferir en su patogenesis entre *L. mexicana* y *L. tropica* (Grimaldi 1980). No obstante, el cruce inmunitario ha sido demostrado entre estas dos especies.

Los trabajos de Miller y Twohy (1969) demostraron que los macrófagos de ratón super infectados pueden inhibir la multiplicación de *Leishmania donovani* *in vitro*. Este fenómeno no ha sido bien demostrado con *Leishmania enriettii* ni con *Leishmania tropica*.

Realmente la relación parásito-célula huésped aparece al existir una leishmania patógena en un huésped particular y puede sobrevivir en el macrófago de este animal pero no en el macrófago de una especie resistente (Behin 1975). Recientemente la destrucción de leishmania patógena por macrófagos de huéspedes susceptibles ha sido demostrado, pero esto involucra la exposición prolongada de los macrófagos a las linfoquinas (Mauel 1978), la exposición de los parásitos al suero inmune (Mauel 1975) o a la acción de otros factores solubles capaces de afectar las funciones de los macrófagos (Handman 1979).

La capacidad de curación de la leishmaniasis *in vitro* ha sido también estudiada para saber como entran y sobreviven en los macrófagos (Chang 1978) este trabajo revela que los parásitos pueden sobrevivir la fagocitosis y multiplicarse dentro de los fagolisosomas. Sobreviven dentro de los lisosomas y aparecen posiblemente como leishmanias que pueden resistir la digestión de las enzimas lisosomales (Lewis 1977).

En 1958 Garnham y Lewis inocularon ratones blancos y hámsters en cultivos con medio NNN de aislados humanos; obteniendo por vía subcutánea e intraesplénica la visceralización y por vía peritoneal obtuvieron resultados negativos. Dávalos y Briseño en 1968 realizaron la infección experimental con cepas mexicanas de leishmaniasis cutánea en ratones y hámsters y encontraron que por vía intraperitoneal y subcutánea se desarrollaron lesiones en ambos animales, en la mayoría visceralización; se presentó metastasis en diferentes partes del tegumento.

Una línea de macrófagos de ratón tolera un continuo y prolifero crecimiento intracelular de *Leishmania mexicana amazonensis* donde los parásitos intracelulares pueden ser aislados por gradientes de centrifugación. (Changkp, 1980).

Se estudio la inmunología y la histopatología de *leishmania mexicana* en ratones C3H y encontraron que difiere de la clásica leishmaniasis cutánea que cura por si misma por la persistencia de lesiones no ulcerativas, no hialinas, y no metastásicas. A pesar de presentar evidencias de la inmunidad humoral y celular. (Grimaldi 1980).

En 1983 Barral y Sacks estudiaron en dos cepas de ratón (C57Bl/6 y Balb/c) el curso de leishmaniasis metastásica y encontraron que el desarrollo del padecimiento en ambas cepas fué asociado a la depresión de la inmunidad celular monitoreada por la hipersensibilidad tardía *in vivo*, lo cual les hace inferir que la leishmaniasis cutánea diseminada y la espondia pueden ser causadas por la misma cepa, y la expresión clínica en los ratones de manera individual es determinada por la respuesta del huésped.

Wilson (1979) propone que el inóculo por vía intradérmica y el uso de amastigotes sean condiciones estándar para la caracterización de leishmaniasis.

Al estudiar en hámsters dorados el comportamiento de tres especies de leishmania (*L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. chagasi*) inoculados por vía subcutánea se encontraron lesiones de evolución progresiva con invasión tardía a bazo e hígado (Rezzano 1985).

También se ha estudiado el comportamiento de *L. braziliensis* en hámster dorado bajo diferentes condiciones experimentales y Travi (1988) observó que la reproductibilidad del comportamiento metastásico de *L. braziliensis* en hámster, bajo corticoesteroides; el resultado positivo es más frecuente en animales no tratados con este medicamento.

En un caso humano de leishmaniasis con lesiones múltiples por *L. ((viannia)) braziliensis* se aislo, y los parásitos recuperados tuvieron un comportamiento en cultivo y en hámster similar a la cepa de *L. ((viannia)) braziliensis* de referencia (Goto 1990).

JUSTIFICACION

Algunos modelos experimentales han sido desarrollados con la intención de reproducir la enfermedad tal como ocurre en el hombre (Champman,1981). Estos modelos han incluido tanto la forma visceral como cutánea, siendo de un valor considerable en estudios sobre mecanismos de inmunidad celular y humoral (Preston y Dumond, 1976).

Hay algunos reportes dentro de la literatura describiendo la histología de las lesiones de leishmaniasis cutánea y mucocutánea durante la enfermedad humana y la infección experimental. (Adler, 1926 y Ridley, 1980); sin embargo los estudios in vivo de cada uno de los eventos externos e internos durante la leishmaniasis seguidos de la inoculación en el hámster dorado como modelo experimental son escasos e incompletos.

A la fecha en México no se ha tenido experiencia en el manejo del hámster como un modelo animal de las leishmaniasis, (Poulter, 1983), este ha sido utilizado como herramienta de aislamiento generalmente (Velasco-Biagi,1967). En otros estudios se ha utilizado al perro (*Canis familiaris*) (Lebrija, Velasco, 1988) como modelo animal para la leishmaniasis cutánea (Velasco,1988) y aunque se considera al perro como un reservorio para la *Leishmania donovani* (Kirmse,1987); en condiciones experimentales no se han obtenido resultados satisfactorios.

Por lo que antes se menciona, se propone el presente estudio con los siguientes objetivos:

OBJETIVOS.

General.

Describir el comportamiento de tres especies de *Leishmania*, inoculados en hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal.

Específicos.

Trazar la secuencia de eventos (macro y microscópicos) que suceden a lo largo de la infección experimental con las diferentes especies de leishmania.

Comprobar la presencia de parásitos en los tejidos mediante cultivos e histopatología.

Conocer las diferencias de tiempo en que las diversas especies tardan en producir lesiones, diseminar, y/o visceralizarse.

Determinar el comportamiento histopatológico que conforme a los hallazgos microscópicos presenten las diversas especies de leishmania en el hámster dorado.

METODOLOGIA.

Animales.

Se seleccionaron 20 hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), machos, de tres meses de edad aproximadamente. Se mantuvieron durante todo el estudio bajo condiciones de laboratorio en jaulas de plástico, sobre un lecho de viruta de madera, a temperatura ambiente.

Parásitos.

CEPA: MHOM/AR85/LB2 (*L. braziliensis braziliensis*)

Aislada de un paciente masculino de 44 años de edad de Salta, Argentina, enfermo de leishmaniasis cutánea con reacción de Montenegro positivo, serología positiva, tipificación biológica en Argentina por César Cuba C. corroboración por el centro de referencia de la OMS por la Dra. Mc Mahon-Pratts.

CEPA: MHOM/IN/CHILD (*L. donovani chagasi*)

Aislado de un paciente infantil masculino de la India; donado gentilmente por National Health Institute U.S.A. Dr. Frank Neva.

CEPA MHOM/MX/33 (*L. mexicana mexicana*)

Aislado de paciente masculino de 36 años, de Cunduacán Tabasco México, enfermo de leishmaniasis cutánea diseminada con reacción de Montenegro negativa, serología positiva. Tipificada por el Dr. R. Kreutzer y la Dra. Mc-Mahon Pratts.

Se realizó un estudio comparativo de tres especies del género *Leishmania*: *L. donovani chagasi*, *L. mexicana mexicana*, y *L. braziliensis braziliensis*; pertenecientes al laboratorio de tripanosomátidos del departamento de Parasitología del INDRE.

Las cepas se han mantenido en pases sucesivos semanales en medios de cultivo con sangre (Anexo 4). Se seleccionó un tubo de cada cepa y se sembró a cuatro tubos con medio de mantenimiento, agregándole suero fetal bovino (3%) y antibiótico (gentamicina 1%). Los cultivos se revisaron cada semana al microscopio, en seco débil. Al obtener una población de parásitos con gran movilidad y escasa formación de parásitos en rosetas se procedió a realizar un pase a un medio de proliferación con el objeto de lograr una curva de crecimiento más alta en un tiempo menor: tomando 1 ml de la fase líquida de medio, se sembró en una caja de cultivo celular de 25 cc que contenía 5 ml de medio RPMI, (Anexo 4) incubándose a 21°C (Campos Neto 1982) y se revisó diariamente hasta obtener el pico de crecimiento en el cual se presentan gran cantidad de promastigotes aislados con una mínima proporción (1%) de formas agrupadas.

La cosecha de parásitos se efectuó centrifugando el contenido de cada caja de cultivo a 5000 rpm a -10°C durante 25 minutos, agregándole solución salina isotónica estéril (SSI) al 0.85% inmediatamente se hizo una observación directa del sobrenadante, se resuspendió la pastilla en SSI en proporción de 10X. Se repitió la centrifugación con los lavados hasta obtener un sobrenadante transparente y un botón blanco. Se agregó un volumen conocido de (5X) a la pastilla y se realizó el conteo en cámara de Neubauer; se efectuaron diluciones (1:10 hasta 1:1000) para ajustar la cantidad del inóculo de 2.5×10^6 parásitos/ml, promediando las lecturas de tres conteos a la misma dilución (Wilson 1987, Berens 1976, Grimaldi 1980, Wilson 1979, Hart 1981).

Se formaron tres lotes con 6 hámsters cada uno, un lote por cada especie y dos organismos testigos mantenidos todos en las mismas condiciones de laboratorio. Los organismos se numeraron mediante la coloración del pelo con ácido pícrico; con el propósito de identificarlos de manera individual durante todo el tiempo de estudio. Se inoculó por vía subcutánea inyectando 0.1 ml de la suspensión de parásitos ajustada a 2.5×10^6 parásitos/ml en cada una de las regiones de inoculación: cojinetes plantares de patas posteriores, nariz y ambos costados de la región abdominal.

En el caso de los testigos se les inoculó el mismo volumen pero de SSI en todas las regiones mencionadas.

Se llevó semanalmente una evaluación de cada organismo, registrando el peso y las alteraciones macroscópicas que fuesen apareciendo, tomando en consideración el aspecto del pelo: erizado, alopecia en placas o generalizada; enflaquecimiento, revisando con particular atención las regiones inoculadas, tamaño y forma de las lesiones. A las seis semanas de incubación se sacrificó un animal de cada lote junto con un testigo, posteriormente se siguieron sacrificando cada dos semanas, sólo un hámster de cada lote, hasta la última etapa se sacrificó al segundo testigo. Se empleó una cámara letal de cloroformo.

Antes de realizar la disección se hizo una última revisión para registrar el aspecto exterior como se había efectuado anteriormente.

Se rasuró la piel de los costados en la región inoculada, cortando un área de 2 cm aprox. Al abrir la cavidad abdominal, se inspeccionó con sumo cuidado la apariencia macroscópica de las vísceras y cada caso fué comparado con el testigo. Se separaron las siguientes vísceras: bazo, hígado, riñones, pulmones, intestino, registrándose siempre su peso, tamaño y aspecto, se tomó una muestra de cada víscera, de las regiones inoculadas y de la médula ósea proveniente de una parte de hueso de las patas traseras.

Depositando las muestras por separado en frascos con SSI estéril para la realización del sembrado en los medios de cultivo (Infante,1980).

Las vísceras junto con la piel se fijaron en formol neutro amortiguado al 10% durante 48 hrs.

Ambas patas posteriores y la nariz fueron rasuradas y cortadas con sierra Stryker.

Para descalcificar las patas y la nariz se utilizó ácido nítrico en formol al 10%, habiéndose fijado previamente con formol neutro amortiguado al 10% (Anexo 5) durante cuatro días (las muestras con contenido óseo requieren más tiempo en fijación para resistir la acción hidrolítica de los ácidos empleados en la descalcificación); el ácido fué cambiado diariamente, evaluando el progreso de la descalcificación puncionando las piezas con un alfiler, hasta sentir blando el tejido.

Una vez fijadas y descalcificadas las muestras, fueron cortadas en pequeños trozos de 1 cm², ya rotulados se colocaron por separado en cápsulas metálicas para su procesamiento posterior:

Deshidratación: Se utilizaron los siguientes alcoholes de menor a mayor concentración: 70°, 80°, 96°, 2 alcoholes absolutos, con una hora de incubación en cada uno. Para aclarar los tejidos se empleó acetona y dos pases de cloroformo con una hora de incubación en cada uno.

En la impregnación se sumergieron las cápsulas en un recipiente con parafina líquida (56°C) haciendo dos cambios de una hora cada uno.

Para incluir se utilizaron rejillas, se agregó parafina líquida al fondo para formar una capa sólida y se introdujo el fragmento del tejido añadiéndole más parafina hasta cubrirlos por completo, se dejó solidificar por 20 minutos.

Los tejidos fueron cortados a un grosor de 5 μ , se colocaron los cortes en baño de flotación a 37°C con gelatina previamente disuelta (1 g/lt) con el fin de extender y adherir los cortes al portaobjetos, con el cual se recogen de modo que queden centrados. Se secan en la estufa a 37°C durante 12 horas.

Para teñir los cortes fué indispensable desparafinarlos e hidratarlos, fueron pasados por xilol 3 veces, y después con xilol-acetona de 5 a 10 minutos cada uno; acetona de nuevo, alcohol absoluto y alcohol 96° durante 2 minutos cada uno, por último se lavo a chorro de agua por 5 minutos.

Los cortes fueron teñidos con la tinción de Hematoxilina y eosina (Anexo 2) y la técnica policrómica Whipf (Anexo 1) (Wilson,1977).

Falta página

N° 31

En primera instancia se utilizó únicamente la tinción de hematoxilina y eosina (Estrada-Flores 1982) pero los resultados en la diferenciación de los parásitos no fué satisfactoria, por lo que se optó por utilizar la tinción policrómica modificada de Whipf, debido a que la bibliografía reporta que se diferencian las estructuras citoplásmicas por el escarlata de Biebrich-orange G, el azul de picroanilina colorea el tejido conectivo y los núcleos son teñidos con hematoxilina férrica.

La observación al microscopio se realizó en 100x y las dos lecturas se efectuaron en ciego.

RESULTADOS:

Leishmania braziliensis:

Hasta la cuarta semana no se presentaron alteraciones macroscópicas en las regiones inoculadas. En la quinta semana se comenzó a observar en las patas traseras de todos los organismos un ligero enrojecimiento y aumento de volumen alrededor del sitio inoculado, que fue aumentando progresivamente hasta tomar un aspecto tumefacto y cianótico muy evidente durante la catorceava semana. Algunos hámsters presentaron alopecia (5/6) y escarificación (4/6) predominando ambas en la parte ventral y la región dorsal cercana a la base de la cola. Cabe mencionar que las regiones inoculadas no presentaron ulceración de las lesiones (Tabla 1).

El organismo sacrificado a la décima semana fue el único que presentó alteraciones macroscópicas en sus vísceras predominando en hígado, bazo y riñones; destacando un aumento considerable en hígado el cual presentó grandes quistes hialinos llenos de líquido amarillento sin olor fétido, éstos distribuidos en todo el órgano con una apariencia circular bien definida, sobresaliente al tejido hepático el tono de este fue más claro que los testigos normales y su textura un poco rugosa. El bazo y los riñones solo mostraron el aumento de tamaño y peso.

En los demás animales el tamaño, la forma y el peso de los órganos macroscópicamente no manifestaron alteraciones (Fig. 5).

Lesiones orgánicas y cambios histopatológicos.

En el animal sacrificado en la sexta semana los órganos no mostraron cambios macroscópicos notables. Sin embargo histológicamente: El hígado mostro infiltrado de linfocitos y macrófagos cerca de las venas centrales. Algunos macrófagos y hepatocitos mostraron presencia de vacuolas y núcleos con cuerpos de inclusión eosinófilico. No se demostraron parásitos.

El bazo mostró ligero aumento en el tamaño de los folículos y algunos eosinófilos en la grasa pericapsular.

Las patas presentaron fibrosis y discreto infiltrado linfocitario y algunas células plasmáticas en tejido subcutáneo e intramuscular. Se demostraron parásitos por cultivo. Naríz y riñones sin lesiones.

En la octava semana sin cambios macroscópicos notables en los organos estudiados. Histológicamente el hígado mostró acúmulo de linfocitos y células epiteloideas con amastigotes constituyendo granulomas, moderada hiperplasia de células de Kúpffer y algunas células gigantes de tipo cuerpo extraño.

El bazo mostró proliferación histiocítica y no se observaron parásitos con claridad.

En las patas hubo fibrosis, edema infiltrado de linfocitos y células plasmáticas y macrófagos con amastigotes en tejido celular subcutáneo e intermuscular.

En la nariz debajo del epitelio respiratorio se observó presencia de amastigotes en varios histiocitos.

La piel, riñones y suprarrenales no mostraron lesiones. Se demostraron parásitos con tinciones de HyE, tricómica de Whiff y se confirmó su presencia en hígado patas y nariz por cultivo en medio bifásico NNN.

El organismo sacrificado en la décima semana presentó en el hígado, bazo y riñones un notable aumento de tamaño y peso.

Histológicamente una gruesa pared fibrosa limitaba las cavidades y el contenido de los quistes no mostraron piochos ni parásitos. El parenquima presentó un infiltrado linfo-histiocitario difuso, vacuolación de hepatocitos y presencia aparente de amastigotes. Los conductos biliares se encontraron dilatados y con colestasis.

El bazo solo mostró intensa congestión y no se observaron parásitos.

En las patas se encontró un intenso infiltrado heterogéneo, linfocitos células plasmáticas, polimorfonucleares y macrófagos con amastigotes. En la nariz se observó un aumento de volumen submucoso, fibrosis y algunos linfocitos e histiocitos sin amastigotes. En riñones se observa la presencia de pequeños focos de pielonefritis cortical, fibrosis intersticial e hidronefrosis. En uno de los cortes de pulmón y en otro de corazón se observó en cada uno lesiones con aspecto semejante a un granuloma.

Se demostraron amastigotes en cultivo de lesiones de hígado y patas.

El organismo sacrificado en la semana doce no tuvo cambios macroscópicos notables, histológicamente el hígado no mostró lesión. El bazo presentó congestión y grasa periesplénica e infiltración de células mononucleares. Los demás órganos no demostraron parásitos en ninguno de los cultivos.

Para la catorceava semana no hay cambios macroscópicos en los órganos observados, aunque histológicamente el hígado presenta granulomas con escasas células epiteloideas y congestión. Algunos hepatocitos con signos de regeneración. No se vieron parásitos.

Bazo congestivo con zonas granulomatosas y tejido adiposo adherido con granulomas. Se observaron claramente amastigotes dentro de los macrófagos e histiocitos. Las patas denotan infiltración linfoide y granulomas de tipo cuerpo extraño con presencia de polimorfonucleares. En nariz y riñones no se observaron lesiones. Los cultivos demostraron parásitos viables en patas y bazo.

TIEMPO (SEM.)	ADELGAZAMIENTO	ALOPECIA PLACAS	ESCARIFICACION	REGIONES INOCULADAS										
				PATAS TRASERAS			NARIZ			PIEL DE LOS COSTADOS				
				I	E	U	I	E	U	I	E	U		
6a.	-	+	+	++	++									
8a.	++	-	-	++++	+++		+							
10a.	++	+	-	+++	+++									
12a.	-	+	+	+++	+++									
14a.	+++	+	-	+++	+++									
16a.	++	+	-	+++	+++									

TABLA 1 Alteraciones macroscópicas ocasionadas por *L. braziliensis*
 En ninguna de las regiones inoculadas se encontró ulceración y en la piel
 de los costados no se observó ninguna anomalía

I= Inflamatoria
 E=Enrojecimiento
 U=Ulceración

++++ Muy abundante
 +++ Notorio
 ++ Moderado
 + Ligero
 - Sin lesión aparente

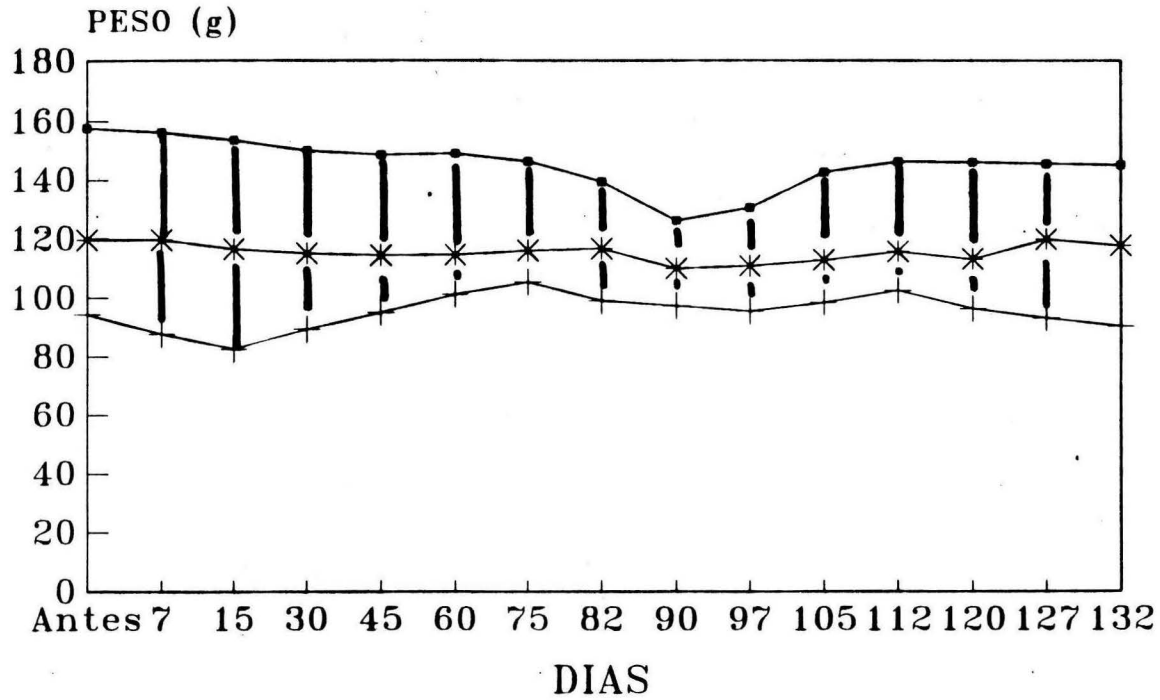
TIEMPO (SEM)	ORGANO	Hist	Mv	Mp	N	Cel Gig	Il	Cp	Eo	Fb	Hv	Gr	Hsia	Pext	Cul	Ck	Cong
6a.	HIG		+			+	+				+						
	BAZO								+								
	RIÑON																
	PATA						+	+		+					+		
	NARIZ																
8a.	HIG					+	+				+	+	+		+	+	
	BAZO	+												+			+
	RIÑON																
	PATA			+			+	+		+				+	+		
	NARIZ	+													+		
10a.	HIG	+	+	+			+		+		+				+		+
	BAZO																+
	RIÑON								+	+							
	PATA	+	+				+	+					+		+		
	NARIZ						+			+							
12a.	HIG		+				+				+						+
	BAZO						+										+
	RIÑON																
	PATA																
	NARIZ																
14a.	HIG	+									+	+		+			+
	BAZO	+		+								+		+	+		+
	RIÑON																
	PATA					+	+					+					
	NARIZ																
16a.	HIG						+				+						
	BAZO	+															
	RIÑON																
	PATA		+	+											+		
	NARIZ											+		+	+		
	* PULMON											+					+

TABLA 4 Hallazgos celulares de cortes histológicos teñidos por H.E. y Whipf de hamsters dorados infectados con *L. braziliensis*.

Hist.	Histiocito	Fb.	Fibrosis
Mv.	Macrófago vacuolado	Hsia.	Hiperplasia
Mp.	Macrófago parasitado	Gr.	Granuloma
N.	Necrosis	Hv.	Hepatocito vacuolado
Nf.	Neutrófilos	P.ext.	Parásito extracelular
Il.	Infiltrado leucocitario	Cul.	Crecimiento en cultivo
Cp.	Célula Plasmática	Ck.	Células de Kupffer
Eo.	Eosinófilos	Cong.	Congestión

PROMEDIO DE PESO HAMSTERS INOCULADOS CON *L. braziliensis*

37



▪ Alto + Bajo * Promedio

FIGURA 5

TIEMPO (SEM.)	ADELGAZAMIENTO	ALOPECIA		ESCARIFICACION	REGIONES INOCULADAS									
		PLACAS	GENERALIZADA		PATAS TRASERAS			NARIZ			PIEL DE LOS COSTADOS			
					I	E	U	I	E	U	I	E	U	
6a.	++	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8a.	-	++	-	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
10a.	-	-	+++	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
12a.	-	+	-	+++	+++	+++	-	+	-	-	-	-	-	-
14a.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16a.	++++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 2 Alteraciones macroscópicas ocasionadas por *L. mexicana*
 En este tiempo no se observó ulceración en las lesiones
 y en la nariz solo en un organismo apareció inflamación.

I= Inflamatoria
 E=Enrojecimiento
 U=Ulceración

++++ Muy abundante
 +++ Notorio
 ++ Moderado
 + Ligero
 - Sin lesión aparente

En la decimosexta semana sin cambios macroscópicos, histológicamente se observaron en hígado pequeños acúmulos de linfocitos, sin llegar a formar granulomas, algunos hepatocitos con cuerpos eosinofílicos de inclusión en los núcleos. El bazo con leve proliferación de histiocitos.

Patas con infiltrado de mononucleares, numerosos macrófagos, algunos con amastigotes. En piel de naríz también se observaron granulomas con amastigotes.

El riñón presentó tiroidización de túbulos (datos de pielonefritis). Se cultivaron parásitos de las lesiones de patas y naríz (Tabla 4).

Leishmania mexicana:

A la cuarta semana posterior a la inoculación se observó inflamación en el sitio inoculado en las patas traseras, que progresó hasta ser más intenso durante la semana 16, involucrando tanto la cara dorsal como la plantar y adquiriendo un tono morado. En la mayoría de los animales se observó alopecia generalizada y uno de ellos adelgazó notablemente. Nunca se observaron pápulas ni úlceras en las patas ni en otros sitios inoculados como la naríz y costados, tampoco presentaron lesiones aparentes (Tabla 2).

Lesiones orgánicas y cambios histopatológicos.

En la observación de la sexta semana no hubo lesiones macroscópicas notables, histológicamente en hígado mostró discreto aumento de linfocitos en espacios porta, el bazo con discreta hiperplasia linfoide y congestión, en patas, naríz y otros órganos (piel, ganglios y riñones) no se vieron lesiones.

En la octava semana el hígado mostró acúmulos linfoides pequeños y dispersos, el bazo hiperplasia linfoide perifolicular; y los demás órganos sin lesión. Durante la décima semana en el hígado además de los acúmulos linfoides se observa vacuolización de algunos hepatocitos y células de Küpffer. El bazo sin cambios, las patas con infiltrado de polimorfonucleares y linfocitos en tejido subcutáneo. La naríz y otros órganos sin lesiones.

Durante la doceava semana, el hígado presentó infiltrado de linfocitos y macrófagos. Hiperplasia y células de Küpffer, dilatación y congestión sinusoidal y algunos núcleos con cuerpo de inclusión eosinofílico. El bazo, patas, naríz y demás órganos sin lesiones.

En la semana 14 el hígado mostró pequeños focos de infiltrado linfocitario y congestión. El bazo sin lesión, al igual que naríz, piel y riñones. En las patas se observó infiltrado de linfocitos y macrófagos.

TIEMPO	ORGANO	Hist	Mv	Mp	N	Cel Gig	Il	Cp	Im	Fb	Hv	Gr	Hsia	Pext	Cul	Ck	Cong
6a. sem.	HIG						+										
	BAZO												+				+
	RIÑON																
	PATA																
	NARIZ																
8a. sem.	HIG						+				+						+
	BAZO												+				
	RIÑON																
	PATA																
	NARIZ																
10a. sem.	HIG		+				+				+		+				+
	BAZO												+				
	RIÑON																
	PATA																
	NARIZ						+	+									
12a. sem.	HIG			+			+					+	+				+
	BAZO																+
	RIÑON																
	PATA																
	NARIZ																
14a. sem.	HIG	+					+										
	BAZO																
	RIÑON																
	PATA		+				+										
	NARIZ																
16a. sem.	HIG						+	+				+		+			(+)
	BAZO	+						+						+			(+)
	RIÑON																+
	PATA																
	NARIZ																

TABLA 5 Hallazgos celulares de cortes histológicos teñidos por H.E. y Whipf de hamsters dorados infectados con *L. m. mexicana*.

Hist.	Histiocito	Fb.	Fibrosis
Mv.	Macrófago vacuolado	Hsia.	Hiperplasia
Mp.	Macrófago parasitado	Gr.	Granuloma
N.	Necrosis	Hv.	Hepatocito vacuolado
Nf.	Neutrófilos	P.ext.	Parásito extracelular
Il.	Infiltrado leucocitario	Cul.	Crecimiento en cultivo
Cp.	Célula Plasmática	Ck.	Células de Kupffer
Eo.	Eosinófilos	Cong.	Congestión

PROMEDIO DE PESO 6 MASTERS INOCULADOS CON L. mexicana

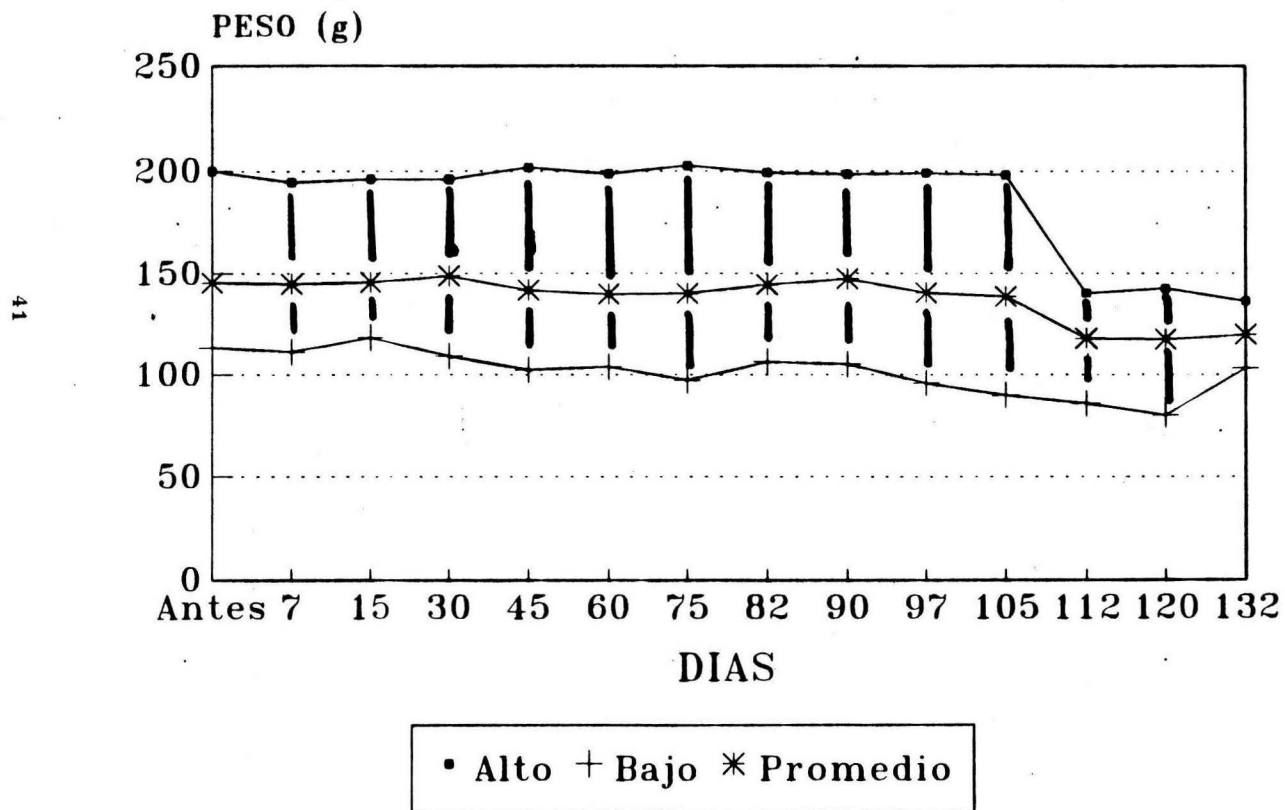


FIGURA 7

TIEMPO (SEM.)	ADELGAZAMIENTO	ALOPECIA		ESCARIFICACION	REGIONES INOCULADAS								
		PLACAS	GENERALIZADA		PATAS TRASERAS			NARIZ			PIEL DE LOS COSTADOS		
					I	E	U	I	E	U	I	E	U
6a.	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
8a.	-	-	-										
10a.	-	-	-										
12a.	-	-	-										
14a.	-	-	-										
16a.	+	++++		++	+	+	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 3 Alteraciones macroscópicas observadas en hamster dorados infectados experimentalmente por *L. donovani*

En las regiones inoculadas en este lote solo se observaron alteraciones en las patas traseras con ligero enrojecimiento, sin inflamación en las demás regiones de inoculación, no se observaron lesiones aparentes.

I= Inflamatoria
E=Enrojecimiento
U=Ulceración

++++ Muy abundante
+++ Notorio
++ Moderado
+ Ligero
- Sin lesión aparente

Falta página

N° 43

TIEMPO (semanas)	ORGANO	Hist	Mv	Mp	N	Nf	Il	Cp	Eo	Fb	Hv	Gr	Hsia	Pext	Cul	Ck	Cong
6a.	HIG				+		+	+				+					
	BAZO																+
	RIÑÓN																
	PATA																
	NARIZ																
8a.	HIG				+		+				+						
	BAZO	+					+										+
	RIÑÓN																
	PATA																
	NARIZ																
10a.	HIG						+				+			+			
	BAZO																
	RIÑÓN																
	PATA																
	NARIZ																
12a.	HIG		+		+		+					+		+			
	BAZO													+			
	RIÑÓN																
	PATA																
	NARIZ	+					+										
14a.	HIG		+				+				+			+			
	BAZO	+												+			
	RIÑÓN																
	PATA																
	NARIZ	+			+		+							+			
16a.	HIG			+								+	+				+
	BAZO	+					+								+		
	RIÑÓN						+										
	PATA	+					+										
	NARIZ	+															
	* PIEL									*							

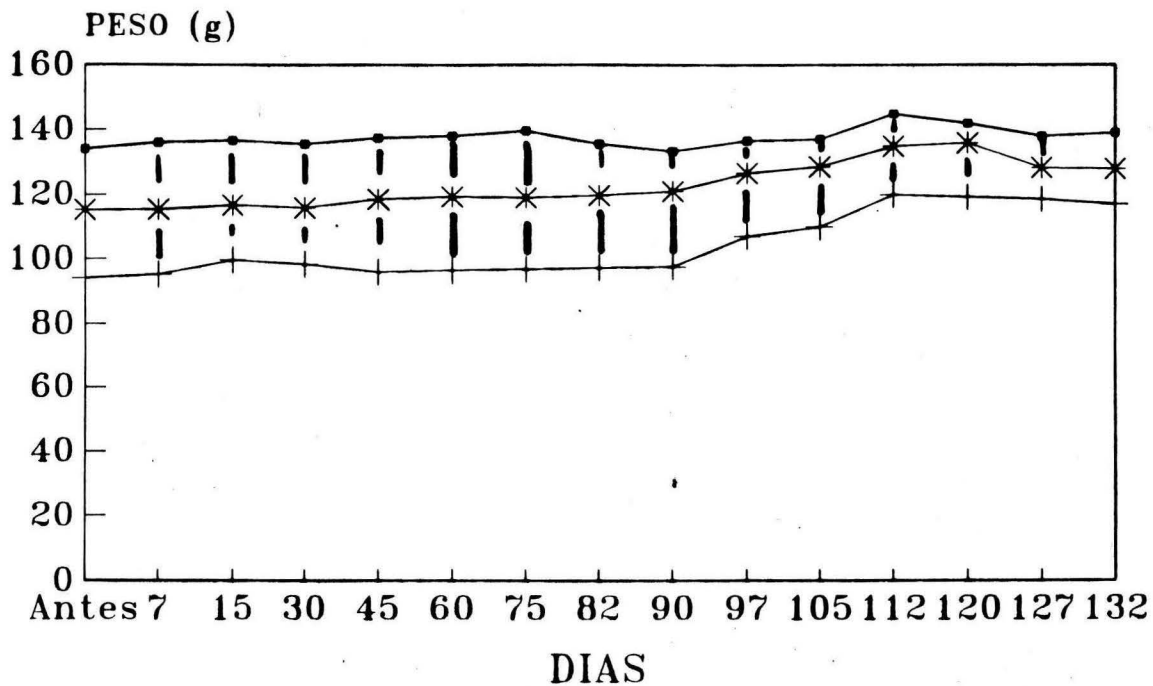
TABLA 6 Hallazgos celulares de cortes histológicos teñidos por H.E. y Whipf de hamsters dorados infectados con *L. donovani chagasi*.

Hist. Histiocito
Mv. Macrófago vacuolado
Mp. Macrófago parasitado
N. Necrosis
Nf. Neutrófilos
Il. Infiltrado leucocitario
Cp. Célula Plasmática
Eo. Eosinófilos

Fb. Fibrosis
Hsia. Hiperplasia
Gr. Granuloma
Hv. Hepatocito vacuolado
P.ext. Parásito extracelular
Cul. Crecimiento en cultivo
Ck. Células de Kupffer
Cong. Congestión

PROMEDIO DE PESO 6 HAMSTERS INOCULADOS CON L. donovani

45



▪ Alto + Bajo * Promedio

FIGURA 6

En la decimosexta semana en hígado se vieron granulomas, sin poder demostrar en ellos presencia de parásitos con tinciones especiales. Pericolangitis y tejido adiposo extrahepático con infiltrado de mononucleares.

En bazo se encontró infiltrado mononuclear en la grasa periesplénica y proliferación de histiocitos en el parenquima. Aunque, al igual que en el hígado, parece que hay amastigotes no fueron demostrados con la tinción policrómica de Whipf. Los demás órganos sin lesiones (Tabla 5).

Respecto a la demostración de parásitos no se observaron ni con tinciones especiales, solo dió la impresión de haber en la sexta observación teñida con HE. Se aislaron amastigotes viables en hígado, riñón y bazo, en las demás muestras no se observó crecimiento. Cabe mencionar que los parásitos presentaron una gran movilidad y un crecimiento abundante.

Leishmania donovani:

En general no se presentaron lesiones macroscópicas externas aparentes durante las observaciones realizadas a lo largo de la inoculación, aunque se hizo muy evidente el adelgazamiento y alopecia muy marcada en casi todo el cuerpo en uno de los organismos (Tabla 3).

Lesiones orgánicas y cambios histopatológicos.

Durante la sexta semana sólo se ve afectado el hígado, cerca de las venas centrales porta, presenta un acúmulo de linfocitos, algunas células plasmáticas, núcleos vacuolados, se observa necrosis con tendencia a formar granuloma, no hay presencia de parásitos. El bazo sólo presenta congestión, y en los demás órganos no hubo lesiones.

A la octava semana el hígado presenta necrosis infiltrado linfocitario portal, algunos núcleos de hepatocitos con nucleólos prominentes. El bazo con un aumento de histiocitos y tejido adiposo capsular, con linfocitos e histiocitos, congestión y posible presencia de parásitos. Los demás órganos con apariencia normal.

En la décima semana el hígado manifiesta infiltrado linfocitario en acúmulos pequeños cercanos a los espacios porta, hepatocitos vacuolados y amastigotes libres. Macroscópicamente el intestino delgado presenta una forma arrosariada y el colon se observa aumentado de volumen. Histológicamente el intestino delgado presenta en mucosa: infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares. En el colon, la submucosa presenta infiltración de linfocitos y polimorfonucleares posibles amastigotes presentes. Los demás órganos no presentaron cambios.

En el organismo sacrificado a la doceava semana no se observan lesiones aparentes ni cambios macroscópicos en las vísceras, en cambio, histológicamente el hígado presentó un infiltrado linfocitario difuso en grandes acúmulos cerca de las venas centrales, las cuales se encontraron dilatadas y congestionadas. Se observa necrosis y regeneración, amastigotes libres, granulomas, macrófagos y células endoteliales. En el bazo se observan numerosos macrófagos con amastigotes.

En la catorceava semana en el hígado continua el infiltrado linfocitario, se observan los hepatocitos con núcleos grandes y nucleólos prominentes, presencia de amastigotes en macrófagos. El bazo con gran cantidad de histiocitos varios de ellos con amastigotes. La nariz presenta edema, polimorfonucleares en epitelio nasal y subepitelial; presencia de amastigotes. En riñón se observa solo pielonefritis.

Para la decimosexta semana el hígado se ve afectado por granulomas hepáticos con amastigotes en macrófagos, hiperplasia de células Küpffer, bazo con discreta cantidad de histiocitos, periesplenitis e hiperplasia linfoide difusa. En patas se observa una discreta hiperplasia de histiocito en tejido subcutáneo. En nariz aparecen pocos histiocitos en tejido subepitelial. El riñón solo con material proteico con acúmulo de linfocitos.

Se constató la presencia de los parásitos viables en riñones y bazo para las demás vísceras y tejido no hubo crecimiento alguno.

(Tabla 6)

ANALISIS DE RESULTADOS.

Eventos macroscópicos.

L. braziliensis fué quién presentó más constantemente adelgazamiento (4/6) a partir de la octava semana, la alopecia fué continua (5/6), y de manera esporádica se dió la escarificación.

Desde el inicio de las observaciones se presentaron las patas con inflamación y enrojecimiento, y al paso del tiempo fueron aumentando progresivamente, en la naríz solo en la octava semana se observó inflamación; en la piel de los costados no hubo ningun cambio.

Para *L. mexicana* el adelgazamiento en los organismos solo se presento en 2 casos a la sexta y a la decimosexta semana de observación, la alopecia fue más evidente tanto en placas como generalizada (4/6). la escarificación fue observada en 3 ocasiones, en los sitios de inoculación; desde la sexta semana se observó inflamación y enrojecimiento que fué aumentando en todos los animales hasta el final del trabajo. En la naríz solo se observó inflamación en la doceava semana. Y en la piel de los costados no se observó anomalía alguna.

En *L. donovani* los cambios macroscópicos no fueron evidentes, sino, hasta la decimosexta semana de observación se encontró adelgazamiento, alopecia muy marcada y escarificación, solo en patas traseras se encontró una ligera inflamación. Destacando entonces que la especie que presenta cambios en etapas de observación más tempranas fue *L. braziliensis*, y enseguida *L. mexicana*. La cepa de *L. donovani*, a lo largo de la experimentación transcurrió sin cambios, notando que el adelgazamiento y la alopecia fué más constante en *L. braziliensis* que en *L. mexicana*, Para estas dos cepas fué frecuente la inflamación y el enrojecimiento de las patas, escasas de inflamación en naríz y no se observa cambios en otras regiones de inoculación en las tres cepas.

Eventos Microscópicos.

Los infiltrados histiоlinfocitarios se presentaron de forma muy uniforme en las cepas desde las primeras observaciones y se siguieron encontrando a lo largo de la experimentación. Los macrófagos vacuolados y parasitados se encontraron al igual que los neutrófilos en mayor cantidad en *L. braziliensis* en las otras dos cepas se observaron pero en menor proporción. Los neutrófilos se observaron sólo en 4 casos de *L. donovani*.

Las células plasmáticas predominaron (4) en *L. braziliensis*, un caso para *L. donovani* y ninguno para *L. mexicana*. Eosinófilos muy escasos, pero presentes en las tres especies. Fibrosis con predominio en *L. braziliensis*, ausente en *L. donovani* y escaso en *L. mexicana*.

Hepatocito vacolados y granulomas mas frecuentes en *L. braziliensis* y escasos en *L. donovani* y *L. mexicana*.

Los parásitos extracelulares más abundantes en *L. donovani* y escasa en *L. braziliensis* y *L. mexicana*. (Tabla 7).

Células Küpffer escasa en las tres cepas.

Congestión abundante en *L. braziliensis* y escasa en *L. donovani* y *L. mexicana*.

semana organo	L. Brasiliensis						L. donovani						L. mexicana					
	6	8	10	12	14	16	6	8	10	12	14	16	6	8	10	12	14	16
Patatas	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naríz	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hígado	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Bazo	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Riñón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros Organos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 7

Presencia de parásitos (amastigotes) demostrados por la tinción policrómica modificada de Whipf's en muestras de hamsters dorados infectados experimentalmente.

ESPECIE	TIEMPO DE APARICION DE LESIONES	DISEMINACION	VISCERALIZACION
Leishmania mexicana mexicana	4a. Semana	----	16ava. Semana
Leishmania braziliensis braziliensis	5a. Semana	----	8ava. Semana
Leishmania donovani chagasi	14a. Semana	----	10ava. Semanas

Tabla 8. Diferencias de tiempo en que las diversas especies tardarón en aparecer lesiones diseminar y/o visceralizarse.



Fig 8. Hígado de hámster infectado con *L. (viannia) braziliensis*. Se observa fácilmente la formación de un granuloma.

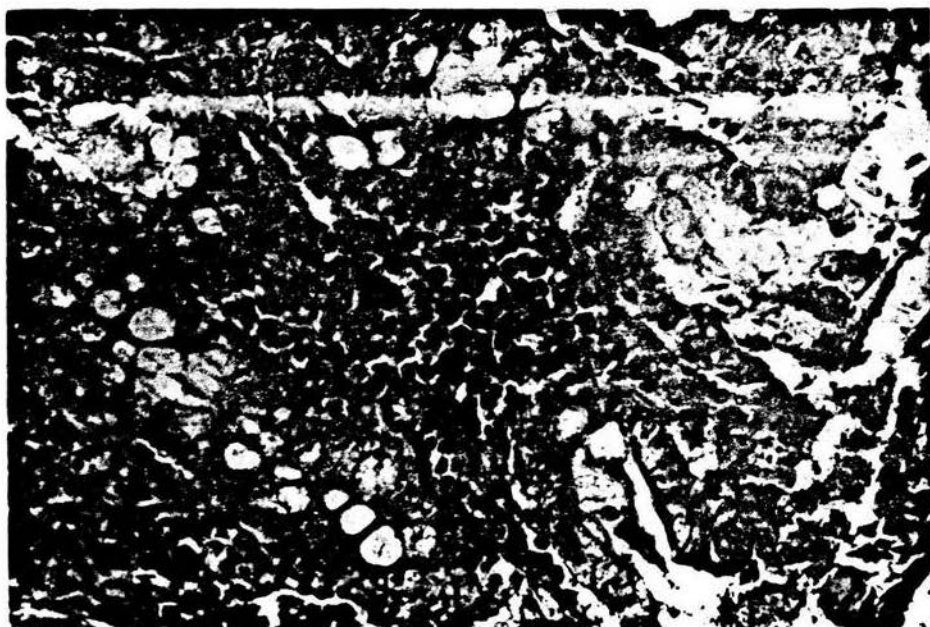


Fig 9. Infiltrado linfocitario encontrado en colon, este hallazgo fue persistente a lo largo de la infección en los diferentes organos estudiados.

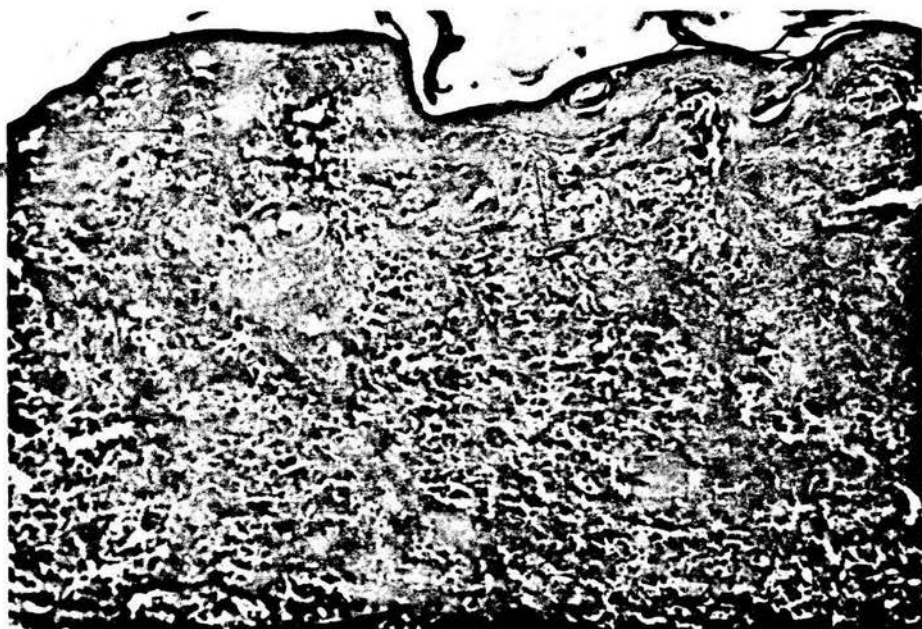


Fig 10. Parenquima de piel de las patas traseras inoculados con *L. mexicana mexicana*. Se observan granulomas subcutáneos teñidos por Whipf.

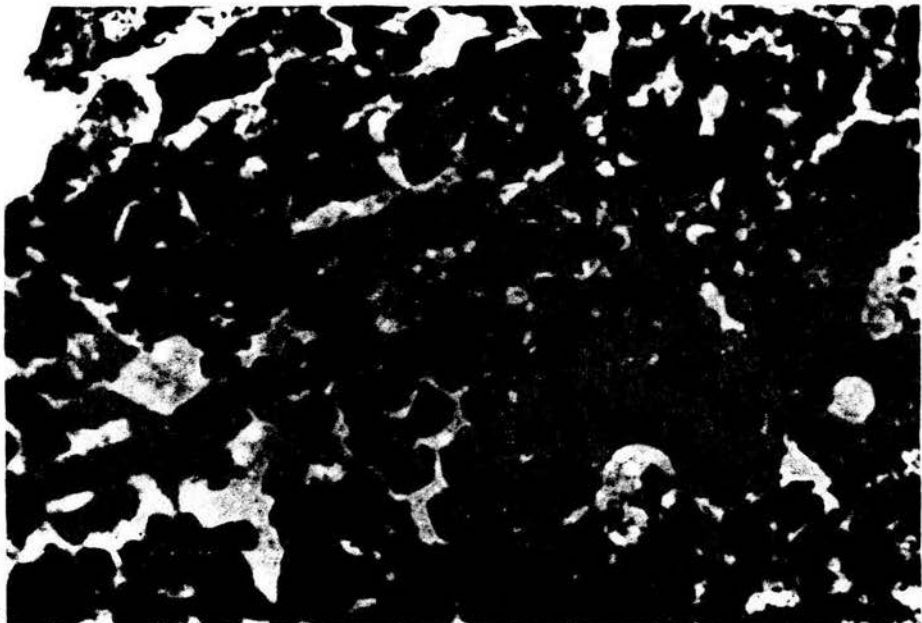


Fig 11. En colon se observan infiltrados de células plasmáticas y linfocitos.



Fig 12. Bazo de hámster inoculado con *L. donovani chagasi* se observa proliferación de histiocitos.

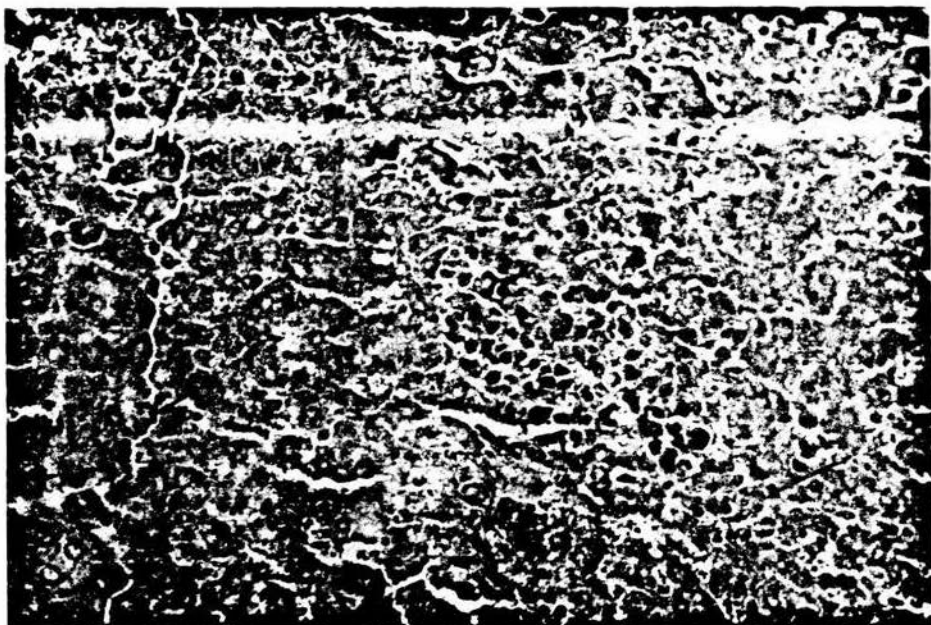


Fig 13. En hígado se observa el detalle de un granuloma con amastigotes.

DISCUSION.

La inoculación por vía subcutánea en tres sitios (naríz, cojinetes plantares de las patas traseras y costados) en hámsters dorados con 2.5×10^6 amastigotes de *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* ocasionó lesiones no ulcerativas de evolución progresiva con invasividad temprana a vísceras. En *L. mexicana* se encontraron con más rápidamente los parásitos en vísceras.

La observación de parásitos en sitios de inoculación fué más temprano en *L. braziliensis* (seis semanas), aunque Wilson (1987) y Wilson (1979) reportan la aparición de parásitos intracelulares y la formación de granulomas desde la cuarta semana de infección. La infección por parásitos en los hámsters en *L. donovani* fue hacia la octava semana tanto en vísceras como en naríz, Barral (1983) al inocular en diferentes cepas de ratón con *L. braziliensis* se desarrollaron granulomas y metastasis ulcerativas.

A lo largo de toda la secuencia del trabajo sólo se encontraron zonas de necrosis en *L. donovani*.

En ninguna de las cepas se constató la formación de nódulos ulcerativos. Solo se observaron lesiones macroscópicas en los cojinetes plantares de las patas traseras, en los demás sitios de inoculación solo se evidenciaron de forma microscópica.

Al no presentarse diseminación en ninguna cepa, ni encontrar lesiones en las regiones inoculadas, podría pensarse que el inóculo trabajado fué muy bajo, aunque en la bibliografía reporta ser una cantidad de parásitos idónea para los hámsters.

La presencia de parásitos en vísceras fué detectada primero en *L. braziliensis* (8 semanas) tal como Dávalos-Mata (1968) lo menciona, que la visceralización se da en un 85% en las cepas inoculando hámsters y ratones.

La existencia de parásitos en los hámsters en *L. donovani* fue hacia la décima semana tanto en vísceras como en naríz.

L. mexicana siguió un patrón de comportamiento similar al que Grimaldi (1980) reporta que al inocular ratones Balb-C con *L. mexicana*. Encontro que la cepa desarrolla una respuesta celular específica que al final controla la parasitemia puesto que no se encontro diseminación en la piel, formación de granulomas ni nódulos ulcerativos.

La hiperplasia se presentó en todas las cepas, siendo la incidencia más común en hígado. Para *L. donovani*. Solo tuvo ésta localización en cambio *L. mexicana* también se observo en bazo, mientras que en *L. braziliensis*, además de hígado también se encuentra en cojinetes plantares de las patas inoculadas.

El hallazgo celular más común en las 3 cepas fué la presencia de linfocitos los cuales aparecieron a la semana de observación persistieron a lo largo de la observación (16 semanas). Hecho que corrobora que todas las variedades clínicas de la enfermedad tiene una característica histológica común: la acumulación temprana de células mononucleares en los tejidos invasivos (OMS, 1984.)

- El infiltrado histiolinfocitario en las tres cepas constituyen el evento más frecuente, considerado para desempeñar un papel de respuesta celular específica.

- La visceralización de *L. donovani* es más clara y constante que *L. braziliensis* y *L. mexicana*: considerando este hecho confirma los datos de Rezzano 1985 quien menciona que el víscerotropismo es más acentuado para *L. donovani* en tanto que el dermatotropismo fue para *L. mexicana*. y *L. braziliensis*. de igual forma.

Por otra parte consideremos también que las cepas ocupadas se han mantenido durante mucho tiempo (más de 80 pases) en medio de cultivo, hecho que disminuye la virulencia en los amastigotes, (Thomas, John, Nolan 1985 y Melo 1987). Disminuyendo así los resultados esperados.

Un hallazgo importante fué el encontrar parásitos en riñón en *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani* y parásitos en *Leishmania braziliensis* en médula ósea.

El hámster dorado es un buen modelo animal dada su alta susceptibilidad a las 3 cepas trabajadas dando además un patrón de comportamiento histológico muy similar al que describe Magalhaes (1986) en donde clasifica varios patrones histopatológicos de leishmaniasis tegumentaria en humanos.

La utilización de la tinción policrómica modificada de Whipf como una técnica confirmativa para demostrar la presencia de los parásitos cuando se obtenían resultados dudosos con la tinción HE resulto ser de trascendental importancia.

CONCLUSIONES.

- 1.- Las tres especies presentaron visceralización, siendo más evidente en *L. donovani chagasi*.
 - 2.- Dentro de las alteraciones observadas en, los animales infectados con *L. (viannia) braziliensis* presentaron con mayor frecuencia adelgazamiento y alopecia.
 - 3.- A partir de la cuarta semana, en los tres lotes de animales, se presentó inflamación y enrojecimiento en las patas traseras con evolución progresiva, sin llegar a las lesiones ulcerativas y en las otras regiones de inoculación (naríz y costados) no hubo cambios aparentes.
 - 4.- Al microscopio, se observó invasividad temprana a vísceras, sin diseminación a piel sana. Los hámsters inoculados con *L. braziliensis braziliensis* 8va. Semana fueron los primeros en visceralizar la infección. La observación de parásitos en los sitios de inoculación fue más temprana en *L. braziliensis*. Las formas parasitarias de *L. donovani* aparecieron en los cortes histológicos hasta la décima semana tabla 8.
- Los primeros cambios macroscópicos se evidenciaron en los animales inoculados con *L. (viannia) braziliensis*.
- 5.- El hallazgo histológico constante fue la presencia de infiltrado histolinfocitario, de aparición temprana en los tres lotes de hámsters y persistente a lo largo del estudio.
 - 6.- La observación de granulomas se dio de manera irregular durante el estudio, en el caso de *L. (viannia) braziliensis* este hallazgo fue más frecuente. Solo en los animales infectados con *L. donovani chagasi* se presentaron zonas de necrosis.
 - 7.- La técnica policrómica modificada de Whopf detectó, con mayor sensibilidad, la presencia de parásitos en cortes histológicos que la tradicional tinción de HE.
 - 8.- La utilización de medios de cultivo para la confirmación de la presencia de parásitos viables, permitió el aislamiento de las tres especies de leishmanias a partir de muestras de hígado, riñón y bazo. Fue posible, también aislar *L. braziliensis* de médula ósea, piel del sitio de inoculación y naríz.
 - 9.- El hámster dorado utilizado en este trabajo, se considera el modelo animal de elección dado su alto grado de susceptibilidad a las tres especies de leishmania estudiadas.

ANEXOS.

Anexo 1.

Tinción Policrómica Whipf modificada.

Preparación de reactivos:

Hematoxilina férrica modificada de Whipf.	
Hematoxilina certificada.....	0.50 g.
Sulfato férrico amonio	0.75 g.
H ₂ SO ₄ 0.6N (acuoso).....	50 ml.
Etanol al 95 %	50 ml.

Se disuelve la hematoxilina en alcohol. Se tritura el sulfato férrico amonio y se disuelve en H₂SO₄ 0.6 N con un calentamiento suave, cuando esté fijo se combinan las soluciones. Deje reposar la noche, agite y filtre use después de 3 a 5 días para mejores resultados.

Solución escarlata de Biebrich-orange G

Escarlata de Biebrich	0.25 g.
Orange G	0.25 g.
Acido fosfomolibdico	0.50 g.
Acido fosfotúngstico	0.50 g.
Acido acético (acuoso).....	100 ml.

Disuelva el ácido fosfomolibdico y el ácido fosfotúngstico en 50 ml de ácido acético al 1%. La solución de escarlata de Biebrich - orange G en los otros 50 ml Cuando esten completamente disueltos combine las soluciones y filtre. El ácido acético al 1% reemplaza el solvente de 1:1 de agua destilada en etanol al 95% de la fórmula original.

Solución azul de picroanilina .

Azul de anilina	0.10 g.
Acido pírico saturado (acuoso)...	100 ml.

Use menos de 1.5 gr de ácido pírico por 100 ml de agua destilada disuelva el azul de anilina y deje reposar de 24 a 48 hrs. para asegurar la saturación.

Procedimientos :

- 1.- Desparafine los cortes lleve a etanol absoluto.

- 2.- Mordente los cortes toda la noche en alcohol pícrico para mejores resultados (ácido pícrico al 6% en alcohol al 95%) enjuague y mantengalo en agua hasta que el color amarillo desaparezca de los tejidos.
- 3.- Deshidrate en alcohol al 75% por 2 minutos.
- 4.- Coloree con hematoxilina whipfs modificada de 5-10 min. siga con agua destilada enjuagando 2 minutos.
- 5.- Tiña con solución escarlata de Briebrich-orange G por 10 minutos.
- 6.- Diferencie escarlata de Briebrich en alcohol 50% por 10 seg.
- 7.- Coloree con azul de picroanilina por 1-3 minutos, enjuague con agua destilada un minuto.
- 8.- LLeve alcohol absoluto con 0.05% de ácido acético por un minuto.
- 9.- Deshidrate con etanol absoluto y xileno.
- 10.- Monte con resina sintética

ANEXO # 2

TINCION DE HEMATOXILINA Y EOSINA

- 1.- Desparafinar dos veces con xilol por 5 minutos.
- 2.- Hidratar con alcoholes 96,80,70 5 minutos cada uno.
- 3.- Teñir con hematoxilina de Harris 7 minutos.
- 4.- Virar en agua de la llave.
- 5.- Deshidratar con alcoholes 50 y 70 por 3 minutos cada uno.
- 6.- Teñir con eosina alcohólica de 1-3 minutos.
- 7.- Deshidratar con alcoholes de 96 (dos cambios) y absoluto, durante 5 minutos cada alcohol y pasar a absoluto.
- 8.- Aclare en xilol con dos cambios de 10 minutos cada uno. Montar con bálsamo de Cánada.

PREPARACION DE COLORANTES

- Hematoxilina de Harris

Hematoxilina (MERK)	1.0 gr
Oxido rojo de mercurio	0.5 gr
Sulfato de aluminio y amonio o potasio (alumbre)	20.0 gr
Alcohol etílico absoluto	10.0 cc
Agua destilada	200.0 cc

- Eosina alcohólica

Eosina azulosa	1.0 gr
Orange	1.0 gr
Alcohol de 70	100.0 cc

Se mezcla todo en frio y se filtra. Filtrar cada vez que se usa.

ANEXO # 3

MEDIO RPMI (1640)

- En el caso de que el medio esté liofilizado se hidrata con agua desionizada 100 ml.

- Filtrar y envasar.

- Al momento de usar:

- A) Agregar bicarbonato de sodio (2 gr por litro).
- B) Corregir pH a 7.2.
- C) Glutamina (si el RPMI inicial no lo tiene) 0.2 ml.
- D) 1 ml de una solución, 2 milimolar por 100 ml de medio
- E) Suero fetal bovino (previamente descoplementado a 56°C por 30 minutos)
- F) Gentamicina 10 μ l/100 ml en medio

Una vez preparado el medio, de nuevo se filtra en Buchner con membranas de 0.45 μ desechables y se vacía en las cajas de cultivos celular.

ANEXO # 4

Medio de mantenimiento para leishmanias.

- Fase sólida:

Agar nutritivo	23 g.
Agua destilada	1000 ml.

Sangre desfibrinada de conejo 15%

- Fase líquida:

BHI (Infusión Cerebro-Corazón)	37 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se esteriliza a 120 lb por 15 min.

Al momento de usar se agrega suero fetal bovino (3%).

SOLUCIONES:

-Solución salina isotónica (SSI) 0.85%

NaCl₂ 8.5 g.

Agua destilada 1000 ml.

Se esteriliza a 120 libras por 15 minutos.

ANEXO 5

- Formol neutro amortiguado al 10%

Agua destilada 900 ml.

NaH_2PO_4 (anhídrido) 3.5 g.

Na_2HPO_4 (anhídrido) 6.5 g.

Formol comercial al 40% 100 ml.

Si las sales están hidratadas las cantidades respectivas son:

NaH_2PO_4 4.02 g.

Na_2HPO_4 16.37 g/l

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamin N, Campino L, Schnur LF, Jaffe C L. 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 13(5):537-50.

Aguirre A, Biagi F, Hernández-Nieto A. 1963. Segundo caso autóctono de kala-azar en México. **Bol. Med. Hosp. Infantil Mex.** 20:317-333.

Alexander J and Phillips RS. 1980. *Leishmania mexicana* and *Leishmania tropica mayor*: Adoptive transfer of immunity in mice. **Exp. Parasit.** 49:34.

Arredondo B y Pérez H. 1979. Alterations of the immune response associated with chronic experimental leishmaniasis. **Infect. Immun.** 25:16.

Báez-Villaseñor J, Ruiloba J y Rojas E. 1952. Presentación de un caso de Kala-azar. **Rev. Invest. Clín. México.** 4:57-58.

Barral A y Petersen EA. 1983. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 32(2):277-285.

Behin R, Mauel J, Biroum-Noerjasin, B and Rowe DS. 1975. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. II. Selective destruction of different *Leishmania* species in activated guinea pig and mouse macrophages. **Clin. Exp. Immunol.** 20:351.

Behlu A and Turk JL. 1976. Establishment of cutaneous *Leishmania enriettii* infection in hamsters. **Infect Immun.** 13:1235.

Beltrán E, Bustamante M. 1942. Datos epidemiológicos acerca de la úlcera de los chicleros. **Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. Méx.** 3:1-28.

Berens RL, Brun R, and Krassner SM. 1976. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. **J. Parasitol.** 62(3):360-365.

Biagi F, Velasco O. 1967. Identidad de *Leishmania mexicana* y su comportamiento en animales de laboratorio. **Gac. Med. Mex.** 97:1412-1417.

Biagi F F y De Biagi A. 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de leishmaniasis mexicana. **Prensa Med. Mex.** Año XXX No.9-12

Biagi FL, R Biagi-B AM. 1983. El Kala-azar en México: Problema ecológico por estudiar. **Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. Méx.** 25:3-12.

- Blackwell J, Freeman J and Bradley D. 1980. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. **Nature**. **283**:72.
- Bonfante GR. 1983. Leishmaniasis tegumentaria en América Latina. **Bol Of Sanit Panam** **95**(5):418-426.
- Broderson JR, Chapman WL Jr, Hanson WL. 1986. Experimental visceral leishmaniasis in the owl monkey. **Vet. Pathol.** **23**(3):293-302.
- Bryceson ADM, Bray RS, Wolstencroft RA and Dumonde DC. 1970. Immunity in cutaneous of the guinea pig. **Clin Exp Immunology** **7**:301.
- Bryceson ADM, Bray RS and Dumonde DC. 1974. Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Selective suppression of cell-mediated immunity during the response of guinea pigs to infection with *Leishmania enriettii*. **Clin Exp Immunol** **16**:189.
- Bryceson ADM, Preston PM, Bray RS and Dumonde DC. 1972. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. Effects of immunosuppression and antigenic competition on the course of infection with *Leishmania enrietti*. **Clin Exp Immunol** **10**:305.
- Bradley DJ, Taylor BA, Blackwell J, Evans EP and Freeman J. 1979. Regulation of *Leishmania* populations within the host. III. Mapping of the gene controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. **Clin Exp Immunol** **37**:7.
- Bray RS. 1972. Leishmaniasis in the Old World. **Br Med Bull** **28**(1):39-43.
- Champan WL, Hanson WL Jr. 1981. Visceral leishmaniasis in the Squirrel Monkey (*Saimiri sciurea*) **J Parasitol** **67**(5):740-741.
- Chang KP. 1980. Human cutaneous leishmania in mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**. **12**(209):240-42.
- Chang KP and Dwyer DM. 1978. *Leishmania donovani*: Hamster macrophage interactions in vitro: Cell entry intracellular survival and multiplication of amastigotes. **J Exp Med** **147**:515.
- Campos-Neto A y Bunn MMM. 1982. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. **Infect Immun.** **38**(1):871-876.
- Coelho VM Couthinho A. 1965. Experimental cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** **7**(3)136-144.
- Díaz-Najera A. 1971. Presencia de *Lutzomyia diabolica* en Múzquis, Coahuila, Méx. (Diptera-Psichodidae). **Rev. Invest. Salud Púb. (Méx)** **31**:62-62.

Dávalos-Mata, Briseño-Ruíz C. 1968. Infección experimental con cepas mexicanas del agente causal de la leishmaniasis cutánea. **Rev Salud Púb Mex** 10(2):159-171.

Disney RHL. 1968. Observations on a Zoonosis: Leishmaniasis in British Honduras. **J Applied Ecology** 5:1-59.

Dennis VA, Chapman WL and Hanson WL. 1985. *Leishmania donovani*: clinical, hematologic and hepatologic changes in Squirrel monkey (*Squimiri sciureus*). **J Parasitol** 71(5): 576-582.

Donovan C. 1903. A posible cause of Kala-azar. **Indian Med Gaz.** 38:478.

Estrada-Flores E, Peralta-Zamora L y Rivas-Manzano P. 1982. Manual de técnicas histológicas. AGT Editor S.A. Primera ed. pp 140.

Garnham PC and Lewis DJ. 1959. Parasites of british Honduras with special reference to leishmaniasis. **Tras Roy Trop Med Hyg.** 53:12-40.

Grimaldi G Jr, Moredrly PL and Hoff R. 1980. *Leishmania mexicana*: Immunology and histopatology in C3 Mice. **Exp Parasitol.** 50:45-56.

Gutierrez Y and Maksem JA. 1984. Pathology changes in murine leishmaniasis (*Leishmaniasis donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. **Pathology** 14(2):222-230.

Goto R. 1990. A case of multiple lesion mucocutaneuos leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis braziliensis* infection. **J Trop Med Hyg.** 93(1):48-51.

Handman E and Burgess AW. 1979. Stimulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of *Leishmania tropica* killing by macrophages. **J Immunol** 122:1134.

Hart DT, Vikerman K, Coombs EH. 1981. A quick, simple method ford purifiyng *Leishmania mexicana* amastigotes large numbers. **Parasitology** 82:345-355.

Ibáñez-Bernal S. 1989. Los dípteros hematófagos de México. IV Simp Nal Entomol Med Vet 81-89.

- Ibáñez-Bernal S. 1991. Memorias teórico-prácticas de artrópodos transmisores de enfermedades. UNAM. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Infante RB y Hernández AG. 1980. A new method for the partial purification of *Leishmania* amastigotes from cutaneous lesions. **Parasitology** **80**:105-112.
- Kudo R. 1986. Protozoology. CECSA Méx. 7a Ed. pp 333-357.
- Kirmese P, Mahr L and Lahrech TM. 1987. Canine Leishmaniasis in Morocco with special reference to infantile Kala-azar. **Trans Royal Trop Med Hyg.** **81**:213-221.
- Keithly JS. 1976. Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamsters. **J Protozool** **23**:244.
- Lainson R. 1982. The American leishmaniasis: some observations of their ecology and epidemiology. **Roy Soc Trop Med Hyg** **77**(5):569-596.
- Laveran A. 1912. Infections of mice and rats by mediterranean and Indian Kala-azar. **Bull Soc Path Exot** **5**:26.
- Lainson R. 1974. *Leishmania* and Leishmaniasis of the new world, with particular reference to Brazil. **Pathol Bull** **7**(4):1-19.
- Leishman WB. 1904. The nature of the Leishman donovan bodies **Brit Med J** **2**:29.
- Lewis DHY and Peters W. 1977. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. **Ann Trop Med Parasit** **71**:295.
- Magalhaes AV, Morales MAP, et al. 1986. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padroes histopatologicos e estudo evolutivo das lesoes. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** **28**(4):253-262.
- Magalhaes AV, Morales MAP, et al. 1986. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. Resposta humoral tissular. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** **28**(5):293-299.
- Magalhaes AV, Morales MAP, et al. 1986. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Reacao celular nos tecidos. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** **28**(5):300-311.
- Magalhaes AV, Morales MAP, et al. 1986. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 4. Classificacao histopatologica. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** **28**(6):421-430.

- Mauel J, Buchmuller Y and Behin R. 1978. Studies on the mechanisms of macrophage activation. I. Destruction of intracellular *Leishmania enriettii* in macrophages activated by cultivation with stimulated lymphocytes. **J Exp Med** 148:393.
- Mauel J, Behin R, Biroum-Noerjasin and Holle B. 1975. Studies on protective cell-mediated mechanisms in experimental leishmaniasis infections. In *Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology*. R Van Furth, Ed Blackwell, Oxford.
- McErlath MJ, Murray HW and Cohn ZA. 1988. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J Exp Med** 167:1927-1937.
- Mandujano VG, Velasco-Castrejón O Soriano J. 1990. Leishmaniasis mucocutánea (espundia) en Tabasco, México. Informe de tres casos. **Patol.** 28:71-78.
- Medina H. 1946. Estudo sobre a leishmaniose. I. Primeiros casos de leishmaniose espontanea observadis em cobaia. **Arch Biol Technol Curitiba.** 1:39.
- Melo MN, Williams P et al. 1987 The change of behavior of two strain of leishmania after cultivation in a defrined medium. *Mem.* 82(4) 557-561.
- Miller HC and Twohy DW. 1969. Cellular immunity to *Leishmania donovani* in macrophages in cultures. **J Parasit** 55:200.
- Monroy-Ostria A. 1986. Relación Huésped-parásito en leishmaniasis. **Infectología (Méx)** 6(7):230-237.
- Neva FA, Petersen EA, Corsey R, Bogart H, Martínez D. 1984. Observations on local health treatment for cutaneous leishmaniasis. *Amer J Trop Med* 33: 800-804.
- Nicolle C. 1908. Reproduction experimental due kal-azar chez le chien avec le virus humain. **Arch Inst Pasteur Tunis** 4:57.
- OPS-OMS. 1984. Las leishmaniasis, Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie de informes técnicos. Ginebra.
- OPS-OMS 1979. Informe de la reunión de trabajo sobre la quimioterapia de las leishmaniasis mucocutáneas. Brasilia.
- OPS-OMS. 1990. Las leishmaniasis, Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie de informes técnicos. Ginebra.
- Poulter L, W. 1983. Leishmaniasis experimental. Biomedical Research Support Grant. 177-193.

Preston PM, Dumonde DC. 1976. Immunology of clinical experimental leishmaniasis. In "Immunology of Parasitic Infections" (S Cohen and E Sadun Eds.) pp 167-202. Blackwell, Oxford.

Pulido PRM. 1983. Ulcera de los chicleros y la leishmaniasis tegumentaria diseminada en México. Tesis profesional. UNAM. Fac. de Química.

Rezzano S, y Scorza VJ. 1985. Comportamiento de *Leishmania chagasi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* en hámsteres machos inoculados subcutáneamente. **Bol Dir Malariología y Saneamiento Ambiental** 25(3,4):59-66.

Roitt J, Brostoff J and Male Dave. 1988. Immunology Ed. Gower Med pp. 17.1-17.16.

Row R. 1914. Experimental leishmaniasis in the monkey and mouse induced by the parasite in culture. **Ind J Med Res** 1:617.

Seminario sobre epidemiología y control de la leishmaniasis en Centroamérica. Panamá, Belice y México. OPS-OMS. 1984. México.

Shaw-Peter K, Quigg L, et al. 1976. Autochthonous dermal leishmaniasis in Texas. **Am J Trop Med Hyg** 25:788-796.

Scorza JV, Valera M, et al. 1979. A new species of leishmania parasite from the venezuelan andes region. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 73(3): 293-298.

Stauber LA. 1958. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. **Rise Institute Pamphlet**. 45:80.

The leishmaniasis. Report. WHO Committee. Techn. rep. Series 701 geneve 1984.

Travi B, et al. 1988. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: Evolution of the infection under diferent experimental conditions. **J Parasitology**. 74(6):1059-1062.

Vargas L: 1978. Presentación cronológica del descubrimiento de las leishmaniasis en el humano. **Salud Pub. (Méx)**: 493-501.

Velasco-Castrejón O. 1989. Los agentes etiológicos de las leishmaniasis cutáneas en México. Presencia de *L. braziliensis* en México. **Rev Latamer Microbiol** 30:231-234.

Velasco-Castrejón O. 1987. Las leishmaniasis en México. **Rev Latamer Microbiol** 29:119-126.

Falta página

N° 73

Velasco-Castrejon O Savarino S Walton B, Neva AF. 1989. Diffuse leishmaniasis in México. **Amer J Trop Med Hyg.** 41:280-288.

Velasco-Castrejón, O. 1990. Las leishmaniasis cutáneas en Tabasco, con especial referencia a la Chontalpa. **Amer. J. Trop. Hyg.** enviado a publicación.

Velasco-Castrejón, O. 1991. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación técnica del INDRE.

Walton BC, Velasco CO, 1987. The distribution and etiology of diffuse cutaneous leishmaniasis in the new world. Proc. Nat Advances Study Institute on Leishmaniasis Zakitnos, Grecia.

Walton BC. 1984. New world Cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis. en Tropical Diseases. RS. Goltsmith, Heyeneman Ed Lang.Med.

WHO. Trropical diseases. 1990. WHO. Div. Control Trop Dis. WND/World Bank WHO.Sp. Prog Research Tran. Dis. TDR >

White MR, Chapman WL, Hanson WL, Latimer KS, Greene CE. 1989. Experimental visceral leishmaniasis in the opossum. **Vet. Pathol.** 26(4):314-321.

Wilson HR, Fair Child DG. 1979. Modified Whipf's polichrome: a conective tissue stain with special aplication for demostrating Leishmania. **Stain technology** 52(2)105-111

Wilson ME, Innes DJ. et al. 1987. Early histopatology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamster. **J. Parasitol.** 73(1): 55-63.

Wilson HR, Dieckmann S. 1979. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* experimental cutaneous infection in golden hamster. **Exp Parasitology** 47:270-283.

Zajtchuk JT, Casler JD. et al 1989. Mucosal leishmaniasis in Brazil. **Laryngoscope** 99(9):925-939.