



Evolución anatómo-patológica de las lesiones causadas por *Leishmania braziliensis* en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) inoculado en el último tercio de la piel del dorso y luego del tratamiento con antimoniato de meglumina y extractos de *Caesalpinia spinosa*.

Laura Urrea Arrieta

Médica Veterinaria

Director:

Berardo Rodríguez, MV, Esp Patol, PhD.

Comité de asesores:

Lina Carrillo Bonilla, MV, MS, PhD.

Sara M. Robledo R. Bacterióloga, MS, PhD.

Maestría en Ciencias Veterinarias con énfasis en patología Línea investigación

Universidad de Antioquia

2021



Tabla de contenido

1. Lista de figuras.....	3
2. Lista de abreviaturas.	5
3. Resumen.....	6
4. Introducción General	8
5. Planteamiento del problema y justificación.....	10
6. Objetivos	13
6.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>13</i>
6.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>13</i>
7. Marco teórico.....	14
7.1. <i>La leishmaniasis.....</i>	<i>14</i>
7.2 <i>Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.....</i>	<i>15</i>
7.3 <i>Epidemiología.....</i>	<i>15</i>
7.4 <i>El parásito.....</i>	<i>17</i>
7.6. <i>Ciclo biológico.....</i>	<i>20</i>
7.7 <i>Caracterización de Leishmania braziliensis.....</i>	<i>21</i>
7.8 <i>Patogenia y respuesta inmune.....</i>	<i>21</i>
7.9 <i>Lesiones anatomopatológicas de la leishmaniasis cutánea en humanos.....</i>	<i>23</i>
7.10. <i>Modelos experimentales.....</i>	<i>26</i>
7.11. <i>Tratamientos convencionales Vs. Tratamientos alternativos.....</i>	<i>29</i>
8. Cuerpo del trabajo.....	32
8.1 <i>Artículo para publicación.....</i>	<i>32</i>
9. Conclusiones generales.....	55
10. Anexos.....	58
11. Bibliografía.....	82

1. Lista de figuras.

Figura 1: Esquema representativo del protocolo experimental del trabajo.

Figura 2. Evolución general de las lesiones macroscópicas y microscópicas.

Figura 3. Frecuencia de presentación de las diferentes lesiones macroscópicas en los animales durante todo el ensayo.

Figura 4. Frecuencia de presentación de las diferentes lesiones microscópicas en los animales durante todo el ensayo.

Figura 5. Asociación entre el diagnóstico macroscópico y microscópico de la piel.

Figura 6. Presencia de amastigotes observados en biopsias de piel respecto al tratamiento.

Figura 7. Detección de carga parasitaria mediante RT qPCR en piel y tejidos extracutáneos (bazo e hígado).

Figura 8. Semana 3, piel de hembra. Relación de lesiones macroscópicas y microscópicas en la piel HS3.

Figura 9. Semana 3, piel de Macho. Relación de lesiones macroscópicas y microscópicas en la piel MS3.

Figura 10. Semana 6, piel de hembra Relación de lesiones macroscópicas y microscópicas en la piel HS6.

Figura 11. Semana 6, piel de macho

Figura 12. Semana 8, piel de hembra (Alyeyuba).

Figura 13. Semana 8, piel de hembra (Glucantime)

Figura 14. Semana 8, piel de macho (Alyeyuba).

Figura 15. Semana 8, piel de macho (Glucantime).

Figura 16. Semana 10, piel de hembra (Alyeyuba).

Figura 17. Semana 10, piel de hembra (Glucantime).

Figura 18. Semana 10, piel de macho (Alyeyuba).

Figura 19. Semana 10, piel de macho (Glucantime).

Figura 20. Semana 16, piel de hembra (Alyeyuba).

Figura 21. Semana 16, piel de hembra (Glucantime).

Figura 22. Semana 16, piel de macho (Alyeyuba).

Figura 23. Semana 16, piel de macho (Glucantime).

Figura 24. Semana 22, piel de hembra (Alyeyuba).

Figura 25. Semana 22, piel de hembra (Glucantime).

Figura 26. Semana 22, piel de macho (Alyeyuba).

Figura 27. Semana 22, piel de macho (Glucantime).

2. Lista de abreviaturas.

PECET: Programa de estudio y control de enfermedades tropicales Universidad de Antioquia

DF: Dermatitis fibrosante

DGD: Dermatitis granulomatosa difusa

DGN: Dermatitis granulomatosa nodular

A: Tratamiento Alyeyuba

G: Tratamiento Glucantime®

S3: Semana 3

S6: Semana 6

S8: Semana 8



S10:	Semana 10
S16:	Semana 16
S22:	Semana 22
H:	Hembra
M:	Macho
SPF:	Specific Pathogen Free

3. Resumen.

Según la Organización Mundial de la Salud OMS, leishmaniasis es un término que abarca varias enfermedades infecciosas producidas por el parásito perteneciente al género *Leishmania*, que es transmitido por la picadura de flebotomos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. La enfermedad en su conjunto se considera “desatendida”, ya que afecta poblaciones humanas principalmente rurales, de bajos recursos. El uso de los antimonios pentavalentes, medicamentos de elección para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea es controversial, por esto, es necesario el desarrollo de nuevos compuestos leishmanicidas menos tóxicos y efectivos, para ello se requiere una comprensión profunda del comportamiento de la infección en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), uno de los principales modelos experimental de la infección.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar la evolución anatomopatológica de las lesiones causadas por *L. braziliensis* en el modelo hámster inoculado en la piel del dorso, así como el efecto sobre las lesiones del tratamiento con Glucantime® intralesional y con alyeyuba (*Caesalpinia spinosa*) vía tópica. Para esto se realizó un estudio de patología experimental con 84 hámsteres cepa LVG (42 machos y 42 hembras de seis semanas de edad) provenientes del bioterio *spf* de la Sede de Investigación Universitaria SIU de la Universidad de Antioquia. Durante el ensayo se realizó evaluación macroscópica de las lesiones cutáneas, necropsia y toma de muestras para evaluación histopatológica en diferentes momentos del ensayo, así como cuantificación de la carga parasitaria de tejido esplénico y hepático de todos los animales infectados, para determinar tropismo extracutáneo del parásito y pieles de los animales de las semanas 6 y 22.

Las lesiones evolucionaron de la siguiente manera: macroscópicamente se desarrollaron nódulos, que evolucionaron a lesiones ulcero costrosas y posteriormente formaron cicatrices. Microscópicamente se observaron inflamaciones en la dermis y en el músculo estriado subyacente con dos patrones de distribución y de tipo de infiltración leucocitaria: el primero difuso piogranulomatoso más frecuente en los machos y el segundo nodular predominantemente granulomatoso en las hembras. Estas lesiones progresaron a dermatitis fibrosante con residuos de infiltración leucocitaria más abundante y extensa en machos que en hembras. El seguimiento histopatológico permitió constatar que los animales tratados con Glucantime® presentaron una mejor respuesta reparativa tisular y una mayor reducción del proceso inflamatorio con respecto a los tratados con Alyeyuba. La infección fue detenida en los órganos linfoides y no avanzó a otros órganos.

Esta investigación constituye la primera evaluación sistemática de la transformación de las lesiones tempranas y tardías causadas por *L. braziliensis* en el hámster dorado, inoculado en la piel del dorso. Describe las diferencias en la evolución de las lesiones con respecto al sexo y en respuesta a dos tratamientos. De esta manera realiza un aporte al conocimiento de la patogenia de la leishmaniasis cutánea y proporciona información necesaria para emplear a este roedor como modelo experimental de esta enfermedad en el humano.

4. Introducción General

La leishmaniasis corresponde a un grupo de enfermedades causadas por más de 20 especies de protozoarios flagelados intracelulares del género *Leishmania* que infectan a humanos y otros mamíferos constituyendo un gran problema de salud pública, prevalente en 98 países, con una incidencia de 1.3 millones de casos nuevos por año, de los cuales solo la mitad es reportada, por lo que la OMS las considera enfermedades desatendidas.(Alvar et al., 2012)

Brasil, Colombia, y Perú son los países con mayor número de especies del género *Leishmania* muchas de ellas afectan al humano, con mayor presentación en zonas rurales y de escasos recursos. En Colombia se considera una enfermedad endémica en



casi todo el territorio Nacional exceptuando San Andrés Islas, Bogotá Distrito Capital (D.C) y el departamento del Atlántico (Ramírez et al., 2016).

La leishmaniasis se caracteriza por tener un amplio polimorfismo clínico, en Colombia la presentación cutánea es la más frecuente en el 99.3% de los casos, caracterizada por el desarrollo de pápulas con progresión a nódulos y úlceras en la piel cuyas secuelas son cicatrices y mutilaciones con consecuencias serias para la calidad de vida de los individuos enfermos, ya que los hace susceptibles a infecciones secundarias y a ser estigmatizados socialmente, lo que afecta psicológica y laboralmente su desempeño (Bennis et al., 2017).

Aunado a esto, el tratamiento convencional de primera elección para la leishmaniasis que es el antimonio de meglumina (Glucantime®), genera efectos adversos frecuentes, tales como: vómito, náuseas, anorexia y pancreatitis (Lyra et al., 2016); su uso prolongado puede causar lesiones renales y cardíacas (Ribeiro-Romão et al., 2016). Lo anterior lleva a muchos pacientes a abandonar los tratamientos, haciéndolos ineficientes; por esto es importante evaluar la eficacia e inocuidad de nuevos compuestos terapéuticos en investigaciones futuras. Para esto es necesario desarrollar modelos experimentales que permitan comparar su similitud con la infección natural en humanos, por lo que se ha propuesto al hámster dorado *Mesocricetus auratus* como un bio-modelo adecuado para evaluar el comportamiento clínico de la infección, ya que es una especie susceptible a diferentes especies de *Leishmania* y las lesiones son similares a las observadas en humanos; sin embargo, dichas lesiones no están completamente caracterizadas desde el punto de vista anatomopatológico en diferentes momentos post infección en este modelo. Esto motivó la realización de esta investigación con el propósito de estudiar la evolución de las lesiones anatomopatológicas en un modelo experimental, para generar información que contribuya al seguimiento de la infección en el tiempo en condiciones de laboratorio.

5. Planteamiento del problema y justificación.

La leishmaniasis es un término utilizado para referirse a un grupo de enfermedades causadas por protozoarios flagelados intracelulares del género *Leishmania*, que infectan a humanos y otros mamíferos.

Este espectro de enfermedades representa un problema para la salud pública, con una amplia distribución mundial, un ciclo de vida complejo y un cuantioso subregistro. Estas enfermedades afectan principalmente a zonas rurales, de bajos recursos y son consideradas por la OMS, enfermedades desatendidas.

Colombia es uno de los tres países en el mundo con más alto número de especies de parásitos del género *Leishmania* que afecta al humano. En casi todo el territorio Nacional se considera una enfermedad endémica, exceptuando el archipiélago de San Andrés Islas, Bogotá D.C y el departamento del Atlántico. Alrededor del 95% al 98% de los casos corresponden a *Leishmania* cutánea, 1% al 4% corresponde a leishmaniasis mucocutánea y entre el 0.1% y 1.5% a leishmaniasis visceral (Sivigila, 2017).

Además de la problemática anterior, los tratamientos convencionales para la leishmaniasis causan grados variables de toxicidad y son costosos, esto lleva frecuentemente a que los pacientes suspendan los protocolos terapéuticos, haciéndolos ineficientes; por esto es importante evaluar la eficacia e inocuidad de nuevos compuestos, que sean el blanco terapéutico para investigaciones futuras.

Para lo anterior es indispensable desarrollar y evaluar modelos animales que reproduzcan la infección y desarrollen lesiones similares a las encontradas en humanos. Por esta razón se han utilizado diversos modelos de experimentación como el ratón, la rata, el perro y primates no humanos. En ellos se ha comparado la similitud de la infección experimental con la infección natural que ocurre en humanos; sin embargo, los mecanismos inmunológicos en cada especie y los mecanismos de evasión parasitaria, no han permitido extrapolar completamente los resultados en dichos modelos al contexto de la enfermedad en el humano (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

El hámster dorado *Mesocricetus auratus* se ha utilizado como bio-modelo para evaluar el comportamiento clínico de la infección causada por parásitos del género *Leishmania* desde el año 1924 (Young, 1914). Este modelo ha sido el que representa de mejor manera la evolución de la enfermedad en humanos, especialmente en infecciones por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, pues además de ser altamente susceptible a la infección es capaz de reproducir lesiones de tipo crónico que permitan la evaluación de respuesta a terapias antileishmaniales en un mayor periodo de tiempo y evaluar diversos tratamientos convencionales y no convencionales (Gómez Galindo, 2012); sin embargo, en esta especie se ha usado principalmente la inoculación en las



extremidades y el plano nasal (Gomes-Silva et al., 2013). Las lesiones producidas en estos sitios afectan el bienestar animal, en consecuencia, generan deterioro sistémico que puede afectar los resultados de las investigaciones y complican la realización de un manejo bioético. Es así, que el PECET propuso la inoculación en el último tercio de la piel del dorso, para mejorar el bienestar de los animales; sin embargo, aunque estudios previos demostraron que el hámster dorado es susceptible a la infección por diferentes especies de *Leishmania* y que las lesiones observadas luego de la inoculación transcutánea en diferentes sitios anatómicos incluyendo la piel del dorso, son similares a las *evidenciadas* en humanos, no se ha descrito la evolución de las lesiones en el tiempo (Robledo et al., 2012). Por esta razón, en esta investigación se realizó la infección experimental de *Mesocricetus auratus* inoculado en el último tercio de la piel del dorso, para caracterizar el desarrollo del cuadro lesional de la infección en el tiempo y verificar si dos tratamientos, uno convencional y otro no convencional, tienen efecto sobre el desarrollo de las lesiones.

6. Objetivos

6.1 **Objetivo general.**

Caracterizar la evolución anatomopatológica de las lesiones por *L. braziliensis* en el modelo experimental *Mesocricetus auratus* inoculado en el último tercio de la piel del dorso, así como en la respuesta a los tratamientos con antimonio de meglumine y aliyeyuba (*Caesalpinia spinosa*).

6.2 **Objetivos específicos.**

Caracterizar las lesiones macroscópicas y microscópicas causadas por *L. braziliensis* y su evolución pre y post tratamiento, mediante análisis anatomopatológico.

Identificar tropismo y la presencia de lesiones asociadas de *L. braziliensis* por tejidos extracutáneos en el modelo Hámster mediante RT qPCR.

Relacionar el grado de las lesiones histopatológicas en los diferentes órganos con la carga parasitaria.

Comparar las lesiones anatomopatológicas de la infección en la respuesta al tratamiento (cura, mejoría y falla).

Detectar características anatomopatológicas que estén asociadas con la evolución clínica de la enfermedad (cura, mejora y falla).

7. Marco teórico.

7.1. La leishmaniasis.

La leishmaniasis corresponde a un grupo de enfermedades producidas por más de 20 especies de parásitos protozoarios intracelulares pertenecientes al género *Leishmania* y es transmitida por aproximadamente 90 especies de insectos hembras del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Kevric, Cappel, & Keeling, 2015). En regiones tropicales y subtropicales, existen tres presentaciones clínicas: la leishmaniasis cutánea, que es la forma más común y se caracteriza por la aparición de lesiones ulceradas, que tras su resolución dejan cicatrices importantes; la leishmaniasis mucocutánea, caracterizada por lesiones mutilantes a nivel de las mucosas y la presentación visceral, asociada a signos sistémicos como fiebre, anorexia, hepatomegalia y esplenomegalia, esta última si no se trata oportunamente puede tener un desenlace letal (Mcgwire, 2014). Este grupo de enfermedades tiene un amplio polimorfismo clínico y su tratamiento, control y prevención constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial. En América, la leishmaniasis cutánea y mucosa se presenta en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos; sin embargo, los países presentan diferentes intensidades de transmisión: baja, media, alta, intensa y muy intensa. En el período 2001-2015 se notificaron a la OPS/OMS, 843.931 casos nuevos de Leishmaniasis cutánea (LC) con un promedio anual de 56.262 casos, distribuidos en 17 de los 18 países endémicos.

7.2 Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis son extremadamente variadas y dependen de varios factores, los principales son: el tropismo y capacidad infectiva del parásito, el número de picaduras infligidas por el vector, así como la composición de su saliva, la respuesta inmune del hospedero y su susceptibilidad genética. Este polimorfismo clínico se puede agrupar en tres presentaciones diferentes: leishmaniasis visceral (también llamada kala-azar o fiebre negra en la India), la forma más grave, con mortalidad del 100 % si no se trata; leishmaniasis mucocutánea o espundia, que produce extensas lesiones destructivas de la mucosa nasal, oral y faringe dando lugar a terribles desfiguraciones y LC, que varía desde lesiones cerradas como pápulas, placas o nódulos, hasta lesiones ulceradas y que, si bien no tiene un curso letal genera cicatrices que comprometen la calidad de vida de los individuos afectados desde el aspecto social, laboral y psicológico (Bennis et al., 2017) además corresponde al 99.3% de los casos de leishmaniasis (OMS, 2017, Mcgwire & Satoskar, 2014).

7.3 Epidemiología.

El grupo de enfermedades denominado leishmaniasis, es prevalente en 98 países, no obstante, solo en 40 su declaración es obligatoria. La incidencia es de 1,3 millones de nuevos casos al año, pero solamente la mitad se reportan (Alvar et al., 2012) además resulta ser la causante de 20.000 a 30.000 muertes anuales mundiales.

En el Viejo Mundo la leishmaniasis se distribuye en el hemisferio oriental y es endémico en Asia, África y sur de Europa. En el Nuevo Mundo tiene una distribución desde el sur de Texas hasta Suramérica con excepción de Chile y Uruguay. Su presentación es en zonas tropicales y subtropicales principalmente, aunque factores como el cambio climático, la urbanización y la deforestación entre otros han contribuido a la difusión de estas enfermedades en nuevas áreas (Kevric et al., 2015).

La leishmaniasis visceral es endémica en 12 países de América. Aproximadamente el 96% de los casos registrados se concentran en Brasil; sin embargo, ha habido una



expansión geográfica en Argentina, Colombia, Paraguay y Venezuela. Durante 2001-2016, fueron reportado 55,530 casos de VL en humanos en América.

La leishmaniasis cutánea y mucocutánea es endémica en 18 países de América. Entre el 2001 y el 2016, se reportaron 892,846 nuevos casos de leishmaniasis cutánea distribuidos en 17 de los 18 países reportados por la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (PAHO). En el 2016, 17 países endémicos reportaron 48,915 casos de leishmaniasis cutánea, mucocutánea, de los cuales el mayor número fue registrado en Brasil (12,690), Colombia (10,966), Perú (7,271) y Nicaragua (5, 423), que en conjunto representan el 74,3% del número total de casos en la región (Who, 2018).

En Colombia la leishmaniasis tiene una amplia distribución incluyendo zonas selváticas de la costa Pacífica y del Amazonas, áreas de bosque seco tropical de la costa Caribe, la región andina, el área de los llanos orientales y los desiertos (Velez et al. 2001). Se han reportado las especies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. colombiense*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (OMS, 2017); sin embargo, las especies más prevalentes, causantes de LC son *L. panamensis*, distribuido en 19 departamentos principalmente en la región andina y *L. braziliensis* distribuida en 17 departamentos predominantemente en el sur del país, asociadas con infecciones intra y peridomiciliarias (Ovalle et al. 2006). Del total de casos reportados a la OMS, se reportaron en Colombia 6.362 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa y 16 casos de leishmaniasis visceral (OMS, 2019).

En la transmisión de estas enfermedades intervienen diferentes vectores y una variedad de reservorios que facilitan su perpetuación en el ambiente, además existe una relación compleja entre parásito, vector y reservorio que dificulta su control en los focos naturales de infección. Colombia se considera uno de los tres países con más alto número de parásitos que afectan al humano (Alvar et al., 2012).

Se han descrito 125 especies de flebotomíneos en el mundo. En Colombia se han descrito 14 especies vectoras, siendo las más frecuentes *L. longipalpis* y *L. evansi* (González et al., 2006). Por otro lado los reservorios pueden ser roedores, cánidos, desdentados, marsupiales, prociónidos, ungulados primitivos y primates (Bañuls et al., 2007), esto hace que la ecología de la enfermedad sea compleja y de difícil control, añadiendo a esto que



los principales sectores afectados son rurales o urbanos de bajos recursos en los cuales no se hace un registro adecuado de los casos presentados, factores que la convierten en un problema de salud pública y una enfermedad tropical desatendida según la OMS.

7.4 El parásito.

El agente causal de la leishmaniasis es un protozoo flagelado perteneciente a la clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae que incluye más de 24 especies de las cuales la mayoría parasita al ser humano. Estas especies están divididas en tres subgéneros de acuerdo a la región anatómica en la cual se desarrolla el parásito en el intestino del vector, estos subgéneros son: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Ramírez et al.2016) (Bañuls, Hide, & Prugnolle, 2007).

Morfológicamente, el parásito se puede encontrar como amastigote de manera intracelular en el mamífero hospedero, principalmente en las células del sistema reticuloendotelial. El amastigote tiene una forma redondeada a ovalada de 2 - 6 micras de diámetro, en los que se identifica un núcleo, un quinetoplasto puntiforme y un flagelo interno. Se puede distinguir una forma flagelada conocida como promastigote en el intestino del vector, que presentan una forma alargada, de 20 por 3-3 micrómetros de diámetro, con un flagelo y quinetoplasto en el extremo anterior (Chang, 1956).

Las diferentes especies de estos protozoos poseen factores de virulencia específicos que le permiten subvertir la respuesta inmune y encontrar en la célula centinela los requerimientos nutricionales y metabólicos para su supervivencia y proliferación. Algunos de ellos son la Zn proteinasa (gp 63), los lipofosfoglicanos, así como algunas



ectoproteínas como la ectokinasa caseína quinasa 1 isoforma 2 (CK1.2) (Lamotte, Späth, Rachidi, & Prina, 2017) (Atayde et al., 2016).

La mayoría de las especies de *Leishmania* tienen un tropismo por piel o mucosas, a excepción *L. donovani* y *L. infantum*, las cuales tienen un tropismo preferentemente por vísceras, sin embargo, algunas especies viscerotrópicas pueden cursar con lesiones confinadas en la piel e igualmente se han descrito casos de presentación visceral por especies con tropismo por piel como *L. trópica* (Nafchi et al., 2016).

7.5 Características genéticas y moleculares de *Leishmania braziliensis*.

La leishmania tiene un mecanismo de control transcripcional común con otras tripanosomátidas, que consisten en genes codificadores de proteínas en la transcripción policistrónica, que son contrascritas por la ARN polimerasa II y el ARN m precursor (Clayton & Shapira, 2007).

Una característica de genoma de leishmania es la presencia de matrices en tándem de genes duplicados que permiten una mayor expresión génica en ausencia del control transcripcional regulado que se encuentra en otras eucariotas.

Se ha informado la secuencia del genoma de tres especies de leishmania: *L. infantum*, *L. major* y *L. braziliensis* (Peacock et al., 2007). Este análisis arrojó una genética altamente conservada y un pequeño número de genes específicos de especie. La mayoría codifican proteínas sin una función conocida, que se ha propuesto, contribuyen al tropismo y patogenia del parásito. En *L. braziliensis* solo una pequeña fracción, aproximadamente el 9% es regulado durante el ciclo de vida (Adaui et al., 2011).

Al igual que otros quinetoplastidos, los genomas de leishmania son caracterizados por un alto grado de síntesis de genes organizados en unidades de transcripción policistrónicas y carecen de grandes regiones subteloméricas. Específicamente el genoma de *L. braziliensis* tiene solo 35 cromosomas como resultado de una fusión que involucra los cromosomas 20 y 34. De estos 35 cromosomas, 30 son trisómicos, tres son

tetrasómicos y uno es hexasómico, lo que indica el alto nivel de heterocigosidad, debida a su triploidía, que le permite tener una mayor tasa de mutación respecto a otras especies de leishmania. (Rogers et al., 2011).

Existen diferencias moleculares en la transformación del parásito de promastigote-amastigote, con la expresión de ciertas moléculas implicadas en la virulencia como el lipofosfoglicano (LPG) y una proteasa de superficie, la gp63, que son expresadas de manera abundante en la superficie de los promastigotes y que sufren una considerable disminución o están ausentes en el estadio amastigote (Descoteaux et al., 2016).

En el subgénero *Leishmania*, el LPG, que estructuralmente es una molécula dividida en cuatro dominios: un lípido de anclaje tipo liso-1-o-alkilfosfatidilinositol, un núcleo hexacárido, una unidad repetitiva fosforilada, tipo PO4 -6 Galb1- 4 Mana-1 , y un dominio terminal, conformado en la mayoría de las especies caracterizadas por un disacárido o trisacárido, se expresa en toda la superficie del promastigote. Consiste en un filamento densamente empaquetado que forma un glicocálix que cumple como función la potencial protección contra enzimas hidrolíticas en el vector. Algunos estudios han demostrado que el LPG, está marcadamente disminuido en *L. braziliensis*, respecto a lo que expresa *L. major* (Muskus et al., 2002).

La glicoproteína gp63, otra molécula ampliamente estudiada, es una metaloproteasa que se encuentra disminuida en los amastigotes. El incremento en la infectividad de los promastigotes está directamente relacionada con un aumento en la expresión de esta glicoproteína, involucrada en la degradación de enzimas lisosómicas nocivas para el parásito dentro del macrófago infectado (Muskus et al., 2002). Adicionalmente se ha descrito una glicoproteína sobreexpresada en la superficie de los amastigotes, conocida como amastina, que contribuye a la capacidad de los amastigotes para sobrevivir dentro de los drásticos cambios ambientales encontrados en los fagolisosomas en estudios que han realizado en las especies *L. major* y *L. infantum* (Rochette et al., 2005).



Otras proteínas expresadas por el parásito para enfrentar las condiciones adversas propia del hospedero mamífero están las proteínas HSP70, las α - tubulinas y la subunidad ND8, descritas y caracterizadas en *L. braziliensis* (Ramírez et al., 2011).

7.6. Ciclo biológico.

El protozoario causante de la leishmaniasis se caracteriza por la presencia de glicosomas y un kinetoplasto con un ADN compuesto por dos tipos de ADN circular llamados minicírculos y maxicírculos (Lopes et al., 2010), que es transmitido por la picadura de una hembra infectada del género *Phlebotomus* (en el viejo mundo) y *Lutzomyia* (en el nuevo mundo), la cual inyecta el estadio infectivo (promastigotes), a través de su probóscide durante la succión de sangre de mamíferos susceptibles a la infección.

Este protozoario tiene dos estadios en su ciclo biológico: el estadio amastigote o la forma intracelular y el estadio promastigote o la forma extracelular. El promastigote se localiza en el intestino del insecto vector hembra, a diferencia de los promastigotes que se encuentran bajo dos formas: promastigotes procíclicos y los promastigotes metacíclicos (Lopes et al., 2010). Los primeros corresponden a la forma replicativa, no son infectivos y se encuentran en el intestino medio del vector, mientras que los segundos son la forma infectiva y se encuentra en la probóscide del vector (Lopes et al., 2010).

Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos y neutrófilos reclutados por la respuesta inflamatoria, los cuales sirven como células de tránsito ya que son incapaces de eliminar los promastigotes y posteriormente serán fagocitados por macrófagos, mediante unión a receptores del sistema complemento y los glicoconjugados como lipofosfoglicanos (LPG) y GP63 del promastigote metacíclico. En ellos los promastigotes quedan contenidos en el fagolisosoma y son transformados al estadio tisular del parásito (amastigotes) que sobreviven a condiciones como un PH de 4.5-6.0 y temperaturas de 30-35 grados centígrados en lesiones de piel y de 37 grados centígrados en otros órganos. Allí se multiplican por división simple hasta causar la lisis de los macrófagos infectados, siendo liberados al espacio extracelular para ser fagocitados nuevamente e infectar a otras células fagocíticas. El ciclo se repite una vez cuando el vector succiona



nuevamente sangre con células infectadas de Amastigotes (Saravia, 1996).

7.7 Caracterización de *Leishmania braziliensis*.

La especie *Leishmania braziliensis* es del género *Leishmania* y subgénero *Viannia*. El genoma de *L. (V.) braziliensis* contiene 33 Mb que codifican para 8.314 genes. Más de 10% del genoma corresponde a secuencias de ADN repetido. Cerca de 99% de los genes se mantienen en sintenia con los genomas de *L. (L.) major* y *L. (L.) infantum*. La identidad del genoma de *L. (V.) braziliensis* con el genoma de las dos especies de *Leishmania* mencionadas anteriormente es de 77%. Se ha reportado que *L. (V.) braziliensis* es triploide en 30 de sus 35 cromosomas, los cromosomas 4, 5 y 29 son tetrasómicos y el 31 es hexasómico (Rogers et al., 2011). Siendo, *L. (V.) braziliensis* la más divergente de las especies hasta ahora secuenciadas (Peacock et al., 2007) y la mayor fuente de variación se observa en el número de copias de genes y pseudogenes (Rogers et al., 2011)

7.8 Patogenia y respuesta inmune.

La instauración de la infección está relacionada con múltiples factores, como el número de picaduras infligidas por el vector, la composición de la saliva de este, y la respuesta inmune del hospedero (Schlein, Jacobson, & Messert, 1992).

El primer acontecimiento es una respuesta inmunitaria de fase aguda en la que predominan neutrófilos y células dendríticas, que son reclutadas e infectadas en las primeras horas. Los neutrófilos pueden contribuir al control de la *Leishmania* a través de las trampas extracelulares de neutrófilos o NETS, o por el contrario, pueden actuar como células protectoras de la misma infección, esto depende de la especie del parásito y del hospedero (Fildary, Pires, & Dosreis, 2011). Además promueven el aumento de CCL3 o quimioquina ligando 3 para el reclutamiento de células dendríticas y macrófagos, siendo estas últimas las principales células hospederas del parásito y las predominantes pocos días después de la infección. El reclutamiento temprano de los monocitos es dependiente de CCL2 o ligando de quimioquinas 2, la cual induce su transformación en macrófagos



tisulares, siempre y cuando haya una adecuada producción de interferón gamma para su activación (Scott & Novais, 2016).

La fagocitosis de los promastigotes por parte del macrófago está mediada por sus receptores de superficie, de todos ellos la fracción tres del complemento parece tener un papel predominante. Los ligandos de *Leishmania* para esta unión son glucoconjugados de superficie como la Zn-proteinasa (gp63), que son genes altamente conservados en la mayoría de las especies de *Leishmania*, así como los lipofosfoglicanos entre otros (Atayde et al., 2016), los cuales inhiben la actividad del fagolisosoma para la replicación del parásito en dicha organela.

En el fagolisosoma de los macrófagos los promastigotes son transformados a la forma replicativa no flagelada llamada amastigote, estos amastigotes inducen una intensa producción de IL-10 por parte de los macrófagos haciéndolos refractarios al influjo de interferón gamma y disminuyendo la producción de IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa, impidiendo así la lisis del parásito (Kane & Mosser, 2001). El principal factor responsable de esta inhibición es el glicolipido fosfoglicano de la superficie del promastigote (LPG), ya que tienen un profundo impacto en el fagosoma causando acumulación perifagosomal de F-actina, disrupción de los microdominios lipídicos fagosomales e inhibiendo la maduración del fagosoma por la asimilación de la NADPHoxidasa y la exclusión del prototipo vesicular-ATPasa de los fagosomas (Moradin & Descoteaux, 2012).

Los mecanismos más importantes para el control de la infección asociados con la inmunidad innata son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) principalmente por parte de los neutrófilos en el momento de la fagocitosis y la liberación de óxido nítrico con la posterior liberación de interferón gamma que activa los macrófagos, ya que la liberación de ROS es insuficiente y se hace necesaria la activación de los macrófagos para la eliminación de los parásitos (Filardy et al., 2011).

La respuesta inmune adaptativa temprana es importante para determinar la resistencia o susceptibilidad a la infección, así pues, la resistencia a la infección está asociada con una

respuesta de tipo Th1 que es estimulada en los linfonodos por parte de la migración de las células dendríticas desde el sitio de inoculación entre las 24 y 96 horas después de la inoculación, las cuales actúan como un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Para esto es necesario la expresión de TLR9 en las células dendríticas que inducen inicialmente la producción de IL-2 y posterior expresión de interferón gamma, para la inducción de la inmunidad celular, como la activación de macrófagos, células NK y la hipersensibilidad retardada (Liese, Schleicher, & Bogdan, 2007).

La susceptibilidad a la infección está relacionada con una respuesta de tipo Th2 y la producción de IL-4 e IL-10, IL-5, IL-9, e IL-13 y está relacionada con la inmunidad humoral, en especial las respuestas mediadas por inmunoglobulina E (IgE). Estudios en humanos y en ratones indican que la interleucina 10 es la citoquina inmunosupresora más importante en la presentación de leishmaniasis visceral (Kane et al., 2001).

Además de las subpoblaciones Th1 y Th2 existen datos sugerentes de la existencia de otras subpoblaciones CD4+ que intervendrían en la respuesta inmunitaria, así como los linfocitos T supresores, CD8+ y las células NK (García-Almagro, 2005).

7.9 Lesiones anatomopatológicas de la leishmaniasis cutánea en humanos.

La infección por leishmanias causantes de la manifestación clínica cutánea, tiene signos clínicos similares a los inducidos en otras enfermedades con cuadros granulomatosos a nivel de la piel (Tiuman & Hijnter, 1992). Inicialmente aparece una lesión eritematosa inespecífica similar a cualquier picadura de mosquito que puede resolver de manera espontánea o, en un lapso de entre una semana y tres meses dar lugar a una lesión específica de leishmaniasis cutánea (Saldanha et al., 2017, Tiuman & Hijnter, 1992).

La forma típica de la leishmaniasis cutánea es una lesión nodular ulcerocostrosa, que es inicialmente papulosa, redondeada a ovalada y es conocida como leishmaniasis cutánea temprana (Machado et al., 2002), esta lesión puede ser levemente pruriginosa y

paulatinamente va tomando un tono rojizo, aumenta de tamaño y entre las dos a cuatro semanas después de las lesiones papulares se desarrolla la úlcera infiltrada en profundidad, en cuyo centro comienza a brotar un exudado seropurulento que se deseca y da lugar a una costra firmemente adherida, la piel adquiere un tono rojizo de aspecto arrugado. Estas lesiones se consideran maduras o tardías y pueden persistir durante semanas e incluso meses y posteriormente iniciar un proceso de reparación desde el centro hacia el exterior causando una cicatriz antiestética de múltiples presentaciones ya que las lesiones de curso crónico usualmente son más polimorfas e induradas, en placa, de bordes papulosos eczematiformes, verrugosas o de aspecto queiloide. Estas presentaciones tienen una peor respuesta a los tratamientos instaurados, aunado a esto, el diagnóstico histopatológico se hace complejo debido a la escasez de amastigotes en las lesiones tardías (Shirian et al., 2014) (García-Almagro, 2005).

Una vez en la dermis, los parásitos desencadenan una respuesta inflamatoria de fase aguda con un infiltrado difuso con predominio neutrofílico, que son las primeras células hospederas de la infección (Baldwin et al., 2007) y en menor cantidad eosinófilos y macrófagos, siendo estas últimas las células hospederas definitivas para el parásito y constituyen la segunda ola de células infiltrantes aproximadamente 48 horas post infección.

Los queratinocitos sobreexpresan CHM de clase II para su posterior activación y presentación antigénica. En esta fase inicial la cantidad de promastigotes en el tejido es mayor y si el infiltrado inflamatorio es severo se puede presentar una pérdida de anexos cutáneos (Gómez Galindo, 2012).

Posterior a la inflamación aguda inicial se presenta una fase silenciosa, caracterizada por la ausencia de lesiones y puede durar pocas semanas a meses, la cual termina con la inflamación extensiva del sitio de la infección y su ulceración, relacionada con una respuesta inflamatoria local severo con presencia de parásitos dentro del citoplasma de los macrófagos y necrosis de la dermis (Uribarren Barrueta, 2014). En los casos en que



se observa poca cantidad de parásitos suelen presentarse macrófagos activados con algunos neutrófilos y linfocitos (Mehregan, Mehregan, & Mehregan, 1999).

En las fases agudas tardías se pueden observar células plasmáticas cuerpos eosinofílicos de “Russel” en su interior, lo cual se relaciona con producción de inmunoglobulinas, las cuales si son de isotipo IgG1 e IgG3 se asocian con resolución de la infección (respuesta Th1), mientras que si son isotipos IgG2 e IgG4 se asocian con susceptibilidad a la infección (Coffman R.L et al., 1988). En las respuestas inflamatorias agudas tardías se evidencia raramente la presencia de granulomas, que tienden a estar rodeados de un infiltrado leve a moderado de histiocitos y linfocitos. En este estadio es raro observar necrosis dérmica del colágeno.

Las lesiones histopatológicas a nivel de la epidermis son hiperplasia pseudoepiteliomatosa con la proliferación de queratinocitos en la epidermis basal, diferentes grados de espongirosis, acantosis, así como exocitosis leucocitaria (Diaz & Ferreira, 2018).

De acuerdo a de Magalhães et al., 1986 las lesiones histopatológicas en la dermis en humanos se clasifican en cinco patrones de lesión, los cuales son: 1. Reacción celular exudativa con un infiltrado de células plasmáticas, histiocitos y linfocitos, 2. Reacción similar a la descrita previamente con necrosis asociada. 3. Reacción granulomatosa exudativa y necrótica, mal delimitada. 4. Reacción granulomatosa exudativa con necrosis ausente. 5. Reacción granulomatosa bien delimitada, con presencia de células plasmáticas, linfocitos e histiocitos. La inflamación granulomatosa se ha asociado con la fase curativa de la infección. Esta lesión característica está conformada por la activación focal de macrófagos con o sin células epitelioides y en algunas ocasiones puede estar presente un infiltrado neutrofilico ocasionando necrosis tisular (Kaye & Beattie, 2016).

En un estudio fue evaluada la relación entre las lesiones histopatológicas y la respuesta al tratamiento, en el cual se observó que se requerían dosis más altas en pacientes que presentaban necrosis, en comparación con aquellos que presentaban células epitelioides



y células gigantes, factor que podría ser determinante para evaluar y predecir la respuesta al tratamiento (Gutierrez et al., 1991).

Así mismo, en este estudio se determinó la correlación entre el tipo de infiltrado con la cantidad de amastigotes, demostrando que el predominio de macrófagos está directamente relacionado con la cantidad de amastigotes presentes, ya que estas células son las células blanco de la infección por leishmania y que, si bien los eosinófilos no son muy frecuentes en estas lesiones, su presencia estaba inversamente relacionada con la cantidad de Amastigotes (Gutiérrez et al., 1991). Así mismo se observó que la cantidad de amastigotes y las áreas de inflamación fueron más acentuados en las lesiones tempranas a diferencia del tamaño de la lesión que estuvo directamente relacionado con la duración de la enfermedad. No se encontró una diferencia entre las áreas de necrosis en las dos fases de la enfermedad.

7.10. Modelos experimentales.

Una de las ventajas que poseen los modelos animales respecto a otros modelos utilizados para el estudio de enfermedades infecciosas es el posible valor predictivo de lo que sucedería en humanos frente a la infección, añadiendo la homogeneidad de las lesiones que se presentan en los grupos tratados de los modelos estandarizados (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014b).

Los modelos animales como roedores, perros y monos han sido desarrollados para caracterizar la respuesta del sistema inmune a las diferentes especies de *Leishmania* y cada uno de estos presenta características específicas, sin embargo, no todos reproducen las lesiones observadas en la enfermedad humana.

Algunas especies de primates tienen una relación evolutiva más cercana a los seres humanos. Entre los modelos animales accesibles, se encuentran los macacos Rhesus asiáticos (*Macaca mulatta*) que son bastante susceptibles a la infección por *Leishmania*,

ya que desarrollan una enfermedad similar a la humana, exhiben anticuerpos contra *Leishmania* y respuestas inmunes mediadas por células T específicas del parásito; este tipo de modelos son útiles para el desarrollo de vacunas (Moore et al., 2013); sin embargo, su uso es limitado por los altos costos que implican su manutención (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014b). Souza et al. 2008, caracterizaron la formación del granuloma asociado a la infección por *L. braziliensis* en un modelo primate. En dicho estudio se observó que, en la fase aguda, tiempo transcurrido entre las dos y 72 horas post inoculación, los neutrófilos y monocitos son reclutados en la piel, mientras que en la fase crónica que comprende entre la semana 2 y la semana 16 post inoculación, predominan los macrófagos, las células epitelioides y células gigantes tipo Langhans rodeadas por linfocitos y plasmocitos. Finalmente, en la fase curativa (semana 24 post inoculación) los fibroblastos proliferan alrededor del granuloma que finalmente es sustituido por tejido fibrótico.

El canino por ser reservorio, pero también sufrir la enfermedad, tiene una atención particular ya que permite entender la respuesta inmune celular protectora frente a la infección y de manera global un mejor entendimiento de la enfermedad para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, tratamientos y vacunas de segunda generación (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a).

El modelo murino ha sido ampliamente utilizado en infecciones por *Leishmania* para conocer la inmunopatología de la infección (Gómez Galindo, 2012). Sin embargo tiene la principal desventaja es tener una respuesta dicotómica, como en el caso del BALB/c que es altamente susceptible, la cual presenta lesiones persistentes y de curso sistémico, a diferencia de las cepas C57BL/6, DBA/2, CBA, C3H/He, CBA/CaH-T6J y 129Sv/Ev, las cuales tienen una respuesta predominantemente de tipo Th1, lo que hace difícil la inducción de lesiones cutáneas crónicas y resulta un inconveniente para el estudio de las lesiones de la enfermedad y no representa lo sucedido en infecciones cutáneas humanas (Gómez Galindo, 2012).



El hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) ha sido utilizado como un modelo para el estudio de enfermedades infecciosas por su fácil manipulación, reproducción y por la evolución de algunas enfermedades, dicho modelo es altamente susceptible a diversas especies de *Leishmania* y es considerado el mejor modelo experimental de leishmaniasis visceral, ya que reproduce las características clinicopatológicas de la enfermedad humana (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a). De igual manera ha sido empleado para el estudio de la leishmaniasis cutánea, utilizando diferentes vías de inoculación, desarrolland lesiones similares a las descritas en humanos (Gomes-Silva et al., 2013). También se ha utilizado para el estudio de diferentes compuestos, tanto convencionales (Robledo et al., 2012), como no convencionales (Taylor et al., 2011),(Gómez Galindo, 2012) .

Las lesiones macroscópicas tempranas en el modelo hámster consisten en pequeños nódulos en la epidermis que posteriormente se ulceran y aumentan su tamaño conforme pasa el tiempo a la semana 4-6 post inoculación. Esta lesión puede persistir incluso hasta la semana 20 post infección (Robledo et al., 2012).

Histopatológicamente se observa el desarrollo de una dermatitis granulomatosa con presencia de macrófagos infiltrando la dermis en cantidad severa (Robledo et al., 2012), así como hiperqueratosis ortoqueratótica, aunque en la actualidad no hay trabajos que realicen una clasificación histopatológica de la lesión en el modelo hámster, sin embargo, (Gomes-Silva, Valverde, Ribeiro-Romão, Plácido-Pereira, & Da-Cruz, 2013) describieron un infiltrado inflamatorio granulomatoso intenso que comprometía la dermis de hámster inoculados en la piel de la almohadilla, constituido predominantemente por macrófagos epitelioides y por cantidad severa de linfocitos, así como la presencia de neutrófilos, plasmocitos y eosinófilos. A su vez, describieron la presencia de un material basófilo lamelar circunscrito correspondiente a cuerpos de Schaumann que habían sido descritos por otros autores en el modelo hámster (Gomes-Silva et al., 2013; L.P., J.E., & J.R., 1990; Laurenti, Sotto, Corbett, da Matta, & Duarte, 1990) pero no se han descrito usualmente en otras especies afectadas por leishmaniasis (Garci, 2002).

En la fase de curación de la lesión cutánea por *Leishmania* se ha descrito el proceso de reepitelización y proliferación a nivel de epidermis; en dermis, se puede observar un descenso gradual de macrófagos y parásitos, en algunos casos fibrosis dérmica, células epitelioides y granulomas, acompañado por producción de IL-12, TNF- α e IFN- γ (Gómez Galindo, 2012)

7.11. Tratamientos convencionales Vs. Tratamientos alternativos.

Los antimonios pentavalentes, la anfotericina B, la miltefosina han sido los tratamientos de elección para todas las presentaciones de leishmaniasis, sin embargo estos tratamientos presentan importantes limitaciones, como en el caso de la miltefosina, la cual es teratogénica y puede provocar importantes efectos tóxicos gastrointestinales con protocolos terapéuticos prolongados; la anfotericina B es nefrotóxica y costosa y la paromomicina necesita una administración parenteral larga que requiere personal calificado y hospitalización. Todos estos efectos promueven el abandono de la terapia causando a largo plazo la resistencia a estos compuestos (Lamotte et al., 2017; Montoya et al., 2015).

El tratamiento de elección para la leishmaniasis cutánea son los antimonios pentavalentes, el más conocido es el Glucantime® y a pesar de que ha sido utilizado por más de seis décadas, el mecanismo de acción es aún poco claro. Se propone que esta molécula interfiere en el proceso bioenergético de los amastigotes, formando complejos estables con los ribonucleosidos que interfieren en la beta oxidación de los ácidos grasos y la glicólisis promoviendo la depleción de los niveles intracelulares de ATP, causando lesiones en el ADN en estudios *in vivo* pero no *in vitro* (Moreira et al., 2017).

Los principales efectos secundarios son artralgia, mialgia, elevación de las enzimas hepáticas, cambios en el electrocardiograma, y otros efectos más severos pueden ser falla renal aguda, leucopenia y pancreatitis, pudiendo causara la muerte (Lyra et al., 2016).



En un estudio en el que se evaluaron 72 pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con Glucantime® el 50% de la muestra presentó sintomatología compatible con pancreatitis como anorexia, náuseas vómitos y dolor abdominal, así como aumento de los niveles séricos de lipasa y amilasa (Lyra et al., 2016).

La anfotericina B es un antibiótico macrólido que se liga a los esteroides de la membrana celular y es uno de los agentes antileishmanicos más utilizados ya que tiene una eficacia del 98% al 100%, sin embargo sus efectos adversos como la toxicidad renal y su alto costo limitan su uso, es por esto que se han desarrollado nuevos compuestos que sean menos tóxicos y más económicos que permitan realizar un tratamiento verdaderamente efectivo, como es el caso de la crema llamada anfoleish, que fue desarrollada por el PECET y está elaborada a base de anfotericina B; dicho ungüento mostró tener una eficacia similar con menos efectos secundarios, mostrando resultados alentadores para curar la afección (Robledo Restrepo Sara María, 2015).

La miltefosina, es un análogo de los fosfolípidos que inhibe el metabolismo de la membrana lipídica bloqueando la biosíntesis de fosfatidilcolina, causando una reducción en la biosíntesis de la esfingomielina dando como resultado aumento de los niveles intracelulares de ceramida y la inducción de la apoptosis e inhibición del crecimiento celular. Este medicamento resulta ser el tratamiento de elección para la leishmaniasis visceral. dentro de los principales efectos adversos se encuentran el vómito, la diarrea y deshidratación, así como aumento en los niveles de transaminasas y creatinina (Gonzales & Vélez, 2006).

En un estudio de farmacovigilancia para evaluar los efectos adversos asociados con la administración de miltefosina en una muestra de 646 pacientes, el 83.7% de los pacientes mostraron efectos adversos durante el tratamiento, de los cuales el 2.3% mostró efectos secundarios severos, el 51% efectos moderados y el resto efectos leves (Pandey et al., 2016).



Debido a los efectos tóxicos presentados con los diferentes tratamientos convencionales se hace indispensable el estudio de nuevos compuestos y terapias que minimicen dichos efectos adversos, así como sus altos costos. Dentro de las posibilidades terapéuticas se encuentran algunos compuestos a base de plantas, por esto la fitoterapia propone extractos activos contra la leishmania a base de saponinas, quinonas, alcaloides, terpenos y derivados de fenoles y otros metabolitos que han mostrado actividad antileishmanica (Cardona-Sánchez, 2006).

Este es el caso de la crema tópica llamada alyeyuba, que está siendo estudiada en el PECET, cuyo principio activo es la *Caesalpinia spinosa*, un arbusto o árbol siempreverde conocido con una gran diversidad de nombres vernaculares: tara, algarroba, huarango, guaranga, tanino, taya y caranca, de distribución predominantemente en regiones estacionalmente secas de Bolivia, Perú y norte de Chile, tanto en la vertiente occidental de los Andes como en los valles interandinos. Además, la especie se encuentra en Venezuela, Colombia, Ecuador, en las Antillas y en Cuba, donde es cultivada (Brokamp, 2009).

Esta planta ha sido utilizada en la medicina popular para tratar afecciones inflamatorias, así como manejo de heridas y úlceras; sin embargo, su mecanismo de acción aún no se conoce completamente. El mecanismo de acción se asocia con el efecto de los terpenos que hay en las vainas de los frutos, que está relacionado con la inhibición enzimática por los fenólicos oxidados que pueden reaccionar con grupos de azufre para producir enlaces covalentes. Los galotaninos ejercen específicamente su acción antimicrobiana debido a su capacidad para quelar el hierro y el cobre disminuyendo la actividad enzimática de los microorganismos (Aguilar-galvez, Noratto, Chambi, & Debaste, 2014), además de tener galactomanano, un polisacárido con efectos inmunomoduladores (Santander et al., 2011). En un estudio se mostró la actividad moderada contra amastigotes de *L. braziliensis* y sin citotoxicidad en macrófagos U-937 mediante citometría de flujo (Robledo et al., 2017).



8. Cuerpo del trabajo.

De la presente investigación se derivó un artículo para publicación que incluye los resultados finales del trabajo. A continuación, se presenta dicho artículo:

8.1 Artículo para publicación.

Anatomopathological evolution of lesions caused by *Leishmania braziliensis* in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) inoculated in the last third of dorsal skin and treated with meglumine antimoniate and *Caesalpinia spinosa* extract

Laura Urrea Arrieta (1), Lina Carrillo-Bonilla (2), Sara M. Robledo (2), Berardo Rodriguez (1) *

1 Pathobiology group Quirón. Faculty of Agricultural Sciences, Universidad of Antioquia. Street 70 # 52-21. Medellín-Colombia

2 PECET. Faculty of Agricultural Sciences, Universidad of Antioquia. Street 70 # 52-21. Medellín-Colombia.

Author's email address: Laura Urrea: laura.ureaa@udea.edu.co; Phone number: +57 4 2199124. Street 67 # 53-108. Medellín-Colombia

Abstract

Leishmaniasis is a term that names a group of infectious diseases produced by a parasite belonging to the genus *Leishmania*, it is considered a neglected disease, since it affects mainly rural, low-resource human populations, and big pharmaceutical houses have no interest and the issue when it comes to drug or vaccine development. Use of pentavalent antimonies, first-line treatment drugs for cutaneous leishmaniasis, is controversial because, although effective, it is highly toxic. Therefore, it is necessary to develop new leishmanicidal with less toxic in order to facilitate adherence to treatment. This requires well-defined and characterized *in vitro* and *in vivo* experimental models to demonstrate infection's response to such new treatments.

The main experimental model to cutaneous leishmaniasis case studies uses golden hamster (*Mesocricetus auratus*) individuals, in these infections by various *Leishmania* species produce clinical manifestations similar to those observed in humans.



The main objective was to characterize anamotopathological evolution of lesions caused by *L. braziliensis* in hamster model inoculated into dorsal skin, as well as the effect of Glucantime® treatment, intralesionally injected and using alyeyuba (*Caesalpinia spinosa*) as topical skin care.

To achieve this goal, an experimental study was carried out with 84 LVG strain hamsters (42 males and 42 females, 6 weeks old) from the spf vivarium at Sede de Investigaciones Universitarias-SIU (University research center, University of Antioquia). During the test, macroscopic and microscopic skin lesions and extracutaneous organs evaluation was carried out at different moments while testing, also quantification of parasitological loads in all infected animals was done.

Macroscopic evolution showed development into nodules that evolved into ulcerous crusted lesions; these formed scars after treatment. Microscopically, dermal and underlying skeletal muscle inflammations were observed. Two distribution patterns and leukocyte infiltration types were found; first corresponded to a diffuse, pyogranulomatous pattern, more frequent in males; and second was a nodular pattern, predominantly granulomatous, more frequently in females. These lesions progressed to fibrosing dermatitis with residues of more abundant and extensive leukocyte infiltration in males than in females. Parasitological migration did not advance to other organs, only lymphoids were affected.

This investigation constitutes the first systematic evaluation of early and late lesions transformation caused by *L. braziliensis* in golden hamster, inoculated on the skin of the back. It describes the differences in the evolution of lesions with respect to sex and in response to two treatments. In this way, results contribute to pathogenesis of cutaneous leishmaniasis knowledge and provide useful information to use this rodent as an experimental model of cutaneous leishmaniasis in humans.

Introduction



Leishmaniasis is the name of a group of diseases caused by more than 20 intracellular flagellate protozoa species of the *Leishmania* genus, which infect humans and other mammals. This disease spectrum constitutes a major public health problem, prevalent in 98 countries with 1.3 million new cases per year incidence, of which only half are reported, this is why WHO considers them neglected diseases (Alvar et al. 2012).

Brazil, Colombia, and Peru are the countries with highest numbers of *Leishmania* genus species, many of them affecting humans, presentation of these species is bigger in rural areas with limited economic resources. In Colombia, it is considered an endemic disease in almost the whole national territory except for San Andrés Islands, Bogotá Capital District and Quindío state or province (Sivigila, 2017).

Leishmaniasis is characterized by a wide clinical polymorphism but in Colombia, cutaneous presentation is most frequent, with 99.3% of cases, characterized by papules development then progressing to nodules and ulcers whose sequelae are scars and mutilations affecting life quality of sick individuals, since wounds make them susceptible to secondary infections and social stigmatization, which affects their quality life both psychologically and occupationally (Bennis et al. 2017).

The first-choice treatment for leishmaniasis is meglumine antimoniate (Glucantime®), which generates frequent adverse effects, such as vomiting, nausea, anorexia and pancreatitis (Lyra et al., 2016); its prolonged use can cause kidney and heart damage (Ribeiro-Romão et al. 2016). This leads many patients to abandon their treatments, affecting the effectiveness; for this reason it is important to evaluate new therapeutic compounds efficacy and safety and also, to make it possible to compare the similarity of natural infection in humans, it is necessary to have *in vivo* models available. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) has been proposed as a suitable bio-model to evaluate *Leishmania* infection clinical behavior since it is a species susceptible to infection by different parasite species and its lesions are similar to those observed in humans;



however, these lesions are not fully characterized from an anatomopathological point of view.

Therefore, this endeavor's objective was to characterize anatomopathological lesions evolution caused by *L. braziliensis* in the experimental model *Mesocricetus auratus* inoculated in the last third of dorsal skin, as well as the response to the treatments with meglumine antimoniate and alyeyuba (*Caesalpinia spinosa*).

Materials and methods

The project fulfilled every experimental animal handling conditions, taking into account Law 84 of 1989 (Colombian Congress) and its protocols were endorsed by University of Antioquia Ethics Committee for experimentation with animals as stated in Act No. 109 of 2017.

Animals

84 golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), males and females, were used, with six weeks of age and weighing between 80 and 90 grams, these were acquired from Charles River Laboratory (Wilmington, MA, USA), raised under conditions free of specific pathogens and managed according to guidelines given by Institutional Committee of the University of Antioquia for experimentation with animals. The sample size was carried out at convenience and following the 3 Rs principle in animal experimentation.

Parasites

Promastigotes in stationary phase were used (day 7 of culture) of *L. braziliensis* strain UA 301, grown in RPMI1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1000 U / mL of penicillin and 0.1 mg / mL of streptomycin, kept and incubated at a 26 ° C temperature.

Hamsters experimental infection with *L. braziliensis*

Inocula of promastigotes *L. braziliensis* were used, 250 million in males and 300 million in six-week-old females, (due to the protective factor associated with females) which were brought to a final volume of 200µL with physiological saline solution. The parasites were inoculated intradermally into hamsters using a syringe (individual) of insulin (1mL), with a 27G needle at dorsal level in the lumbo-sacral region. A previous anesthetic protocol using ketamine (Imalgene 1000®) 50 mg / kg and xylazine (Rompun® 2%) (20 mg / kg) intraperitoneally at doses according to previously established protocols (Robledo et al., 2012) was done. A weekly clinical examination to animals was carried out since infection until 12 weeks after completing both treatments.

Test phases

The hamsters were distributed in three phases: infection or experimental inoculation corresponding to weeks 3 to 6, initiation of treatments corresponding to weeks 8 and 10 and, finally, response to treatment monitoring, from weeks 16 to 22. During the whole trial, reference to any of these three phases, or to each of the weeks according to interest, was done. 60 infected animals were used, of which 30 were males and 30 females, the untreated healthy animals control group had 24 animals, of which 12 were males and 12 females.

Infection or inoculation phase

During weeks 3 and week 6 post inoculation, the animals were monitored as previously mentioned, also euthanasia and necropsy of 3 males and 3 females was carried out to take samples that will be described in the anatomopathological analysis. Hamsters were previously anesthetized intraperitoneally with 0.2 mL 5% ketamine (50 mg / kg) and 2% xylazine (20 mg / kg) in a 9: 1 ratio.

Monitoring of response to treatments

This phase corresponded to weeks 8 and 10 post inoculation. Treatments began at week 6 post inoculation, at this point lesions reached an average 4 mm wide (transverse diameter) by 4 mm high (sagittal diameter) size, at which time typical lesion of infection was generally established. Two treatment groups with two compounds were established, corresponding to Glucantime® and Alyeyuba (*Caesalpinia spinosa*), both with four weeks duration as follows:

24 animals were randomly selected and treated with lyophilized meglumine antimoniate (Glucantime®) dosified intralesionally in 200 mg / kg and two applications per week. Another 24 animals were treated topically every twelve hours with Alyeyuba (emulsion + lotion).

In weeks 8 and 10, three males and three females treated with each compound were selected, for a total of 12, and euthanasia was performed to take samples described in the anatomopathological analysis. Hamsters were previously anesthetized intraperitoneally with 0.2 mL 5% ketamine (50 mg / kg) and 2% xylazine (20 mg / kg) in a 9: 1 ratio.

Treatment monitoring

This is the final phase that corresponds to weeks 16 and 22. After completing the four weeks of treatments, the treatment outcome was defined as clinical cure, improvement or therapeutic failure, using the classification reported in previous studies (Robledo et al. 2012) in which it is defined:

Clinical cure: characterized by the total re-epithelialization of the lesion at the time of euthanasia, without the presence of clinical signs of inflammation such as: erythema, pain, heat in the area, or ulcerative or nodular lesions.

Improvement: lesion decrease close to 50% compared to the initial one, which can be ulcerative or nodular.

Therapeutic failure: increase in the area of the lesion compared to the initial size, which may be ulcerative or nodular, with the presence of the previously mentioned clinical signs of inflammation.

Three males and three females treated with each compound were randomly selected for euthanasia and sampling at weeks 6 and 12 post treatment.

Pathological analysis

Every two weeks, lesions were measured with a digital caliper and macroscopic appearance was evaluated, and supported with photographic records. Information obtained was recorded in the vivarium clinical monitoring format by using following descriptors, based on the lesions previously described by various authors (Zachary et al. 2012) (Williams and Uzal, 2011):

Nodule: elevated, firm, circumscribed lesion with a rounded shape, greater than, or equal, to 1 cm diameter, indurated and erythematous, immobile and apparently adhering to adjacent tissues.

Ulcerative-ulcer crusted lesion: concave lesion, with raised edges and induration at the base, sometimes irregular, central, reddish, of variable sizes, with exposure of the dermis. It may present a firmly attached crust, consisting of a dry, dark-colored exudate, located on skin's surface.

Scar: lesion of variable thickness and size, firm, retracted, pale or whitish, which replaces normal skin after injury.

At weeks 3, 6, 8, 10, 16 and 22 post inoculation, euthanasia was performed in a CO₂ chamber.

When confirming death, necropsy was done and tissue samples were taken from: liver, spleen, kidney, inoculated skin area, heart, pancreas, digestive mucous, superficial inguinal lymph node and lung, with 0,5 cm maximum thickness; then they were fixed in 10% formalin and sent to Animal Pathology Laboratory (University of Antioquia) for histopathological analysis. There they were embedded in paraffin and cut with a microtome to obtain a 3 microns thickness and ulteriorly stained with hematoxylin-eosin. Both histopathological changes and amastigotes presence in samples were assessed on a quantitative scale, with values from 0 to 5 according to following findings and descriptors in order to perform statistical analysis and corresponding diagramming:

0. No lesions: tissues did not present significant microscopic findings.
1. Mild: findings show a focal affected area involving less than 20% of evaluated sample.
2. Mild to moderate: lesions showed focal or multifocal distribution involving between 20% and 40% of evaluated sample.
3. Moderate: lesions have a multifocal distribution pattern and involve between 40% and 60% of evaluated sample.
4. Moderate to severe: lesions have a multifocal or diffuse distribution pattern that involves between 60 and 80% of evaluated sample.
5. Severe: lesions have a diffuse distribution pattern that involves more than 80% of evaluated sample.

In accordance with the above, a histopathological classification of the findings was performed in the following lesion diagnosis, which were based on the injury patterns suggested by other authors (Kennedy, 2016) (Williams and Uzal, 2011):

Nodular granulomatous dermatitis: characterized by a circumscribed mixed infiltration, it compromises dermis, hypodermis and underlying muscle; it is predominantly made up of foamy macrophages with large vacuolated cytoplasm and a variable amastigotes, epithelioid cells, and some multinucleated giant cells amount. To a lesser extent, lymphocytes, plasma cells, eosinophils, and neutrophils can be seen, associated with



variable necrosis degrees and presence of a circumscribed basophilic material corresponding to Schaumann bodies.

Diffuse granulomatous dermatitis: poorly delimited lesion, characterized by presence of a diffuse, mixed infiltration, consisting mainly of macrophages, epithelioid cells, giant cells and neutrophils, with severe necrosis and Schaumann's bodies presence.

Fibrosing dermatitis: fibrous tissue showing exuberant formation, with extension towards deep dermis and underlying muscle, associated with a mononuclear infiltration with a predominance of lymphoplasmacytic and histiocytic to a lesser extent.

Fibrosis without inflammation: lesion characterized by fibrous tissue formation without associated inflammatory process.

Evaluation of extracutaneous parasitological load by real-time PCR (RT-qPCR)

Samples taken at necropsies were preserved in RNAlater (Qiagen, Frankfurt, Germany) and stored at -80 ° C. Inclusion criteria for performing PCR were: liver and spleen fragments from all infected animals, skin fragments from the animals at week 6 and week 22, point in time when treatment started and when test ended respectively. Also, any extracutaneous organ other than those previously mentioned which presented histopathological changes or amastigotes.

RNA was extracted from 30 mg of tissue using Trizol® (Invitrogen, CA); following manufacturer instructions, which in brief are: tissue was macerated using Power gene 125 (Fisher Scientific), then 200 µL of chloroform (Merck®) were added, mixed and centrifuged at 14,000 rpm for 20 minutes at 4 °C temperature. Aqueous phase was transferred to a tube and RNA was precipitated with 800 µL of isopropanol (Merck) and centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4 °C temperature. The RNA was washed with 70% ethanol (Merck) and centrifuged for 5 minutes at 7500 rpm at 4 °C temperature. RNA was



resuspended in 30 μ L of nuclease-free water and quantified with a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Parasitical load was determined by RT-qPCR using the SYBR Green Verso 1-step qRT-PCR Kit (Thermo Scientific®). For this, a reaction was prepared with a final volume of 25 μ L as follows: 50ug of RNA (1 μ L), 100 ng (0.5 μ L) of primer GCACGAATGCCGACTACTTC direction and 100 ng (0.5 μ L) of primer GCCTTGGAGTCGTAAATGGA anti-direction, 12.5 μ l of the mix and 10.5 μ L of nuclease-free water.

Primers amplified glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene from *Leishmania braziliensis*. Amplification reaction was carried out in a Light cycler 96 (Roche®) with the following protocol: 50 °C 15 min, 95 °C 15 min and 40 cycles 95 °C 15 s, 60 °C 20 s and 72 °C 20 s , a final cycle 72 ° C 300 s and a melting curve between 60 and 95 ° C. Nuclease-free water was used as a negative control and RNA extracted from promastigotes in culture was used as a positive control.

**

Parasitical load was determined by absolute quantification; For this, a standard curve was constructed from a *L. braziliensis* promastigotes recount in a Neubauer chamber, RNA was extracted from 10 million parasites, which were eluted in 20 μ L, leaving an RNA concentration corresponding to 500,000 parasites per μ L, then the standard curve was constructed on a base 5 logarithmic scale as follows: 390,625, 78125, 15625, 3125, 625, 125, 25 and 5 parasites.

Statistic analysis

The trial design was completely randomized. Data processing was performed with the R statistical software. Univariate binary logistic regressions were used to identify associations between response and explanatory variables. A penalty logistic regression model (Firth) (Heinze & Ploner, 2018) was used to reduce small sample bias effect on coefficients in logistic regressions. Additionally, some models were adjusted with weights

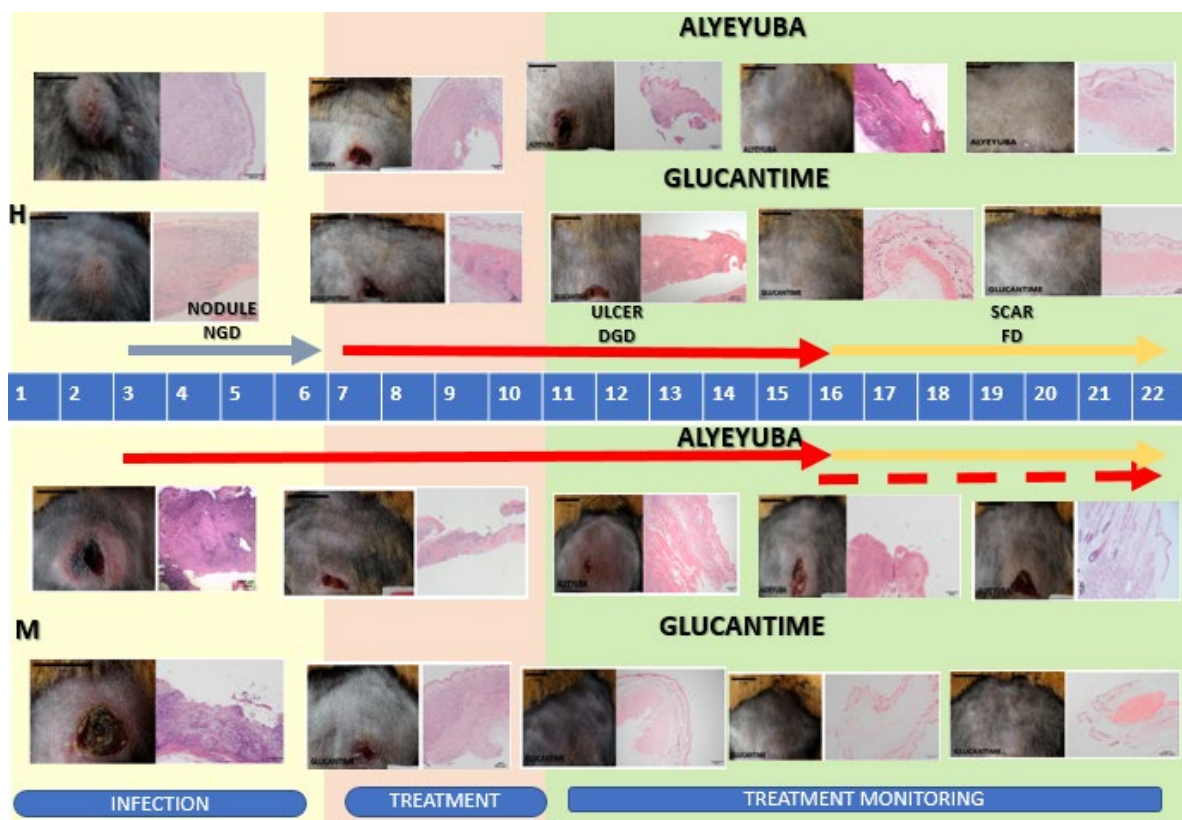


to balance coefficients according to the number of cases per categories in some variables (sex). The response variables were categorized as follows to be used in the logistic regression: 1 = presence, 0 = absence.

Three types of models were developed to verify associations between: 1) presence of macroscopic lesions (ulcerocrusted, scar) and microscopic (3 dermatomyositis categories) and different explanatory variables (treatments, weeks and evaluation phases, anatomopathological findings ...); 2) parasites presence in spleen and liver according to these explanatory variables: a) macroscopic and microscopic lesions b) sex and c) study phases (infection, initiation of treatment and response to treatment evolution); 3) clinical cure based on the explanatory variables: a) sex and b) presence of some histopathological characteristics (minerals presence, fibrosis and necrosis). A model was developed to evaluate each one of the associations separately. Models adjustment was evaluated with a plausibility test and the P values were calculated using "Wald" method. Those associations in which the explanatory variables presented $P \leq 0.05$ were considered meaningful. The results of the regressions were expressed as odds ratio and its respective confidence interval (95%).

Results

Characterization and evolution of macroscopic and microscopic skin lesions



Macroscopic lesions

In weeks 3 and 6, corresponding to infection development, the infected animals presented indurated nodules, rounded or ovoid, sometimes erythematous, which evolved into ulcers with thickened, reddish edges and a central purulent depression. Between weeks 8 and 16, the treatment response period, these lesions dried out and turned into crusts. Finally, while weeks 16 and 22, time corresponding to follow-up of the response to treatment, the

ulcerative lesions progressed to smooth, depressed, whitish scars with variable sizes (Figures 1 and 2).

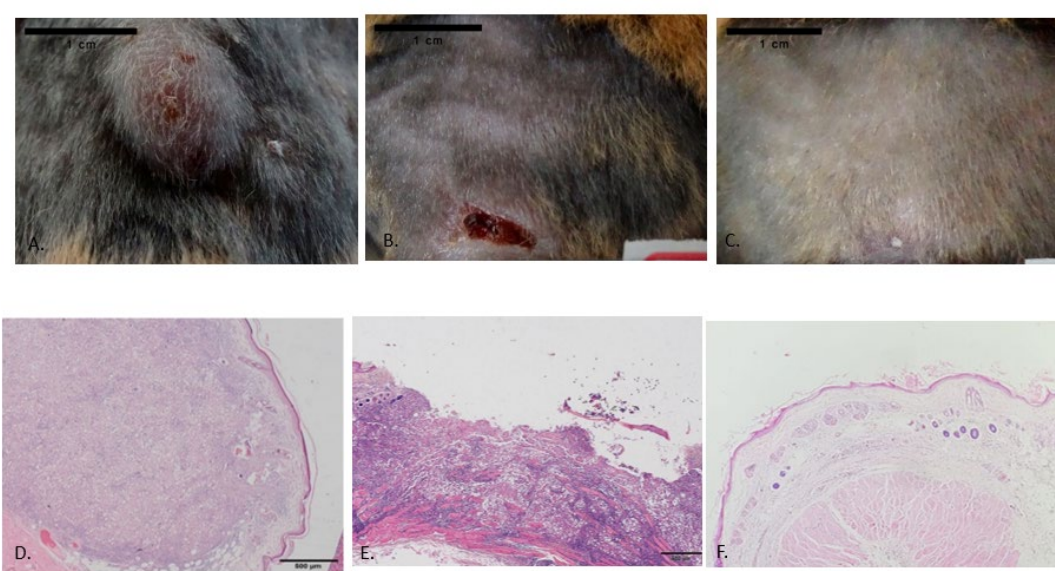


Figure 1. General evolution of macroscopic and microscopic lesions. During infection development formation of a nodule that evolves into an ulcerative lesion, and later to a scar, is observed. **A.** HS6 nodule. **B.** Ulcer MS8A. **C.** Scar HS22A. **D.** Nodular granulomatous dermatitis (NGD) **E.** Diffuse granulomatous dermatitis (DGD). **F.** Fibrosing dermatitis (FD). Hematoxylin-eosin stain.

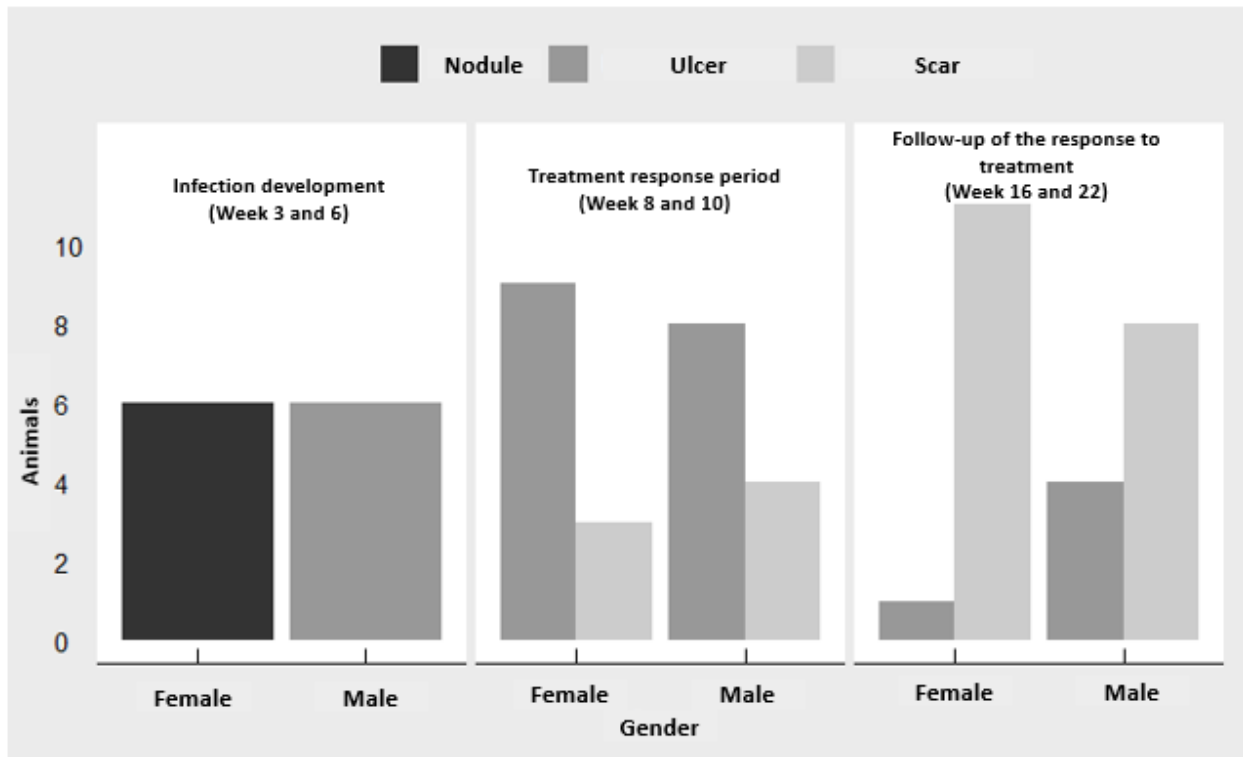


Figure 2. Presentation frequency of different macroscopic lesions in animals throughout the trial.

Although there was no statistical association between sex and macroscopic lesion type, during infection development, nodules only developed in female individuals in this phase. In contrast, all males had ulcerocrusted lesions in this same test period.

Greatest ulcerogenesis occurred in week 8; ulcerocrusted lesions were less common in weeks 10, 16 and 22 when compared with week 8: 0.2, 0.1 and 0.06 times less, respectively (Table 1)

Table 1. Comparison by logistic regression of ulcerocrusted lesions frequency in trial weeks

Lesion	Week	Ocurrence ^a	Odds ratio	IC 95% ^b	P value
Ulcerocruste d	Week 8	11:5	2,20	0,80-6,98	
	Week 10	5:11	0,21	0,04-0,87	
	Week 16	3:13	0,10	0,02-0,49	
	Week 22	2:14	0,06	0,01-0,34	<0,05

^a Occurrences. Animals with lesion: animals without lesion. ^b CI 95% = Confidence interval of quotient probability.

Ulcers appeared in 36.7% (11/30) of females, these lesions persisted until week 16. In males, the ulcer appeared in its 56.7% (17/30) persisting on average until week 16, excepting two males in which persistence was even until the end of the trial (week 22).

The reparative process, formation of a smooth, depressed scar, whitish and with variable sizes, began earlier in females (week 8) than in males (week 10), however, there were no differences about quantity of healed animals according to sex.

Additionally, scars were commonly observed at weeks 16 and 22 when compared to weeks 8 and 10 (see table 2).

Table 2. Comparison by logistic regression of scar frequency according to treatment response phase and response to treatment follow-up phase

Lesion	Test phase	Observations ^a	Odds ratio	IC 95% ^b	P value
--------	------------	---------------------------	------------	---------------------	---------

Scar	Treatment	7:25	2,29	0,12-0,63	
	Follow-up	19:13	4,91	1,74-15,05	<0,05

^a Occurrences. ^b CI 95% = Confidence interval of quotient probability.

Microscopic lesions

Animals in the control group did not show skin lesions at any time during the trial.

In general, the histopathological lesions found in nodules and ulcers described in infected animals of both sexes corresponded to mixed granulomatous or pyogranulomatous inflammations with two distribution patterns: diffuse and nodular that progressed to fibrosing dermatitis associated with reparative process described above as smooth scars.

The histopathological patterns of injury observed throughout the trial are described below (see Figure 4):

Nodular granulomatous dermatitis (NGD): this lesion type was observed in the nodules, in some ulcerative lesions and in some fibrosing dermatitis already described macroscopically. Microscopically, a circumscribed mixed infiltration was observed, which compromised dermis and hypodermis and spread to underlying muscle, generating myositis. This infiltration was predominantly made up of foamy macrophages showing large vacuolated cytoplasm with a variable amount of amastigotes, epithelioid cells, and some multinucleated giant cells. To a lesser extent, lymphocytes, plasma cells, eosinophils, and polymorphonuclear cells were evidenced, associated with variable degrees of necrosis. Additionally, the presence of a circumscribed basophilic material corresponding to Schaumann bodies was observed. NGD was associated with sex in the first weeks, being ten times more common in females than in males (Table 3). In the other periods, no such association was present.

Table 3. Comparison by logistic regression between males and females at weeks 3 and 6, according to microscopic NGD lesion occurrence.

Tipo lesión	Associated variable	Occurrences ^a	Odds ratio	IC 95% ^b	P value
NGD	Male	1:9	0.13	0,03-0,43	
	Female	6:4	10.69	1,98-77,19	<0,05

^a Occurrences. NGD: Nodular granulomatous dermatitis. ^aObservations number. Presenting NGD: not presenting NGD^b CI 95% = Confidence interval of quotient probability.

Diffuse granulomatous dermatitis (DGD): this lesion pattern was observed in nodules and ulcerated lesions, these presented semi-hard consistency and were poorly defined. The pattern was characterized by a diffuse mixed infiltration present in dermis, it spread to underlying skeletal muscle; this infiltration was made mainly of macrophages, epithelioid cells, giant cells, and abundant neutrophils. Severe necrosis and presence of Schaumann bodies were also observed. A significant statistical association (p-value <0.05) was determined between DGD in the period called “response to treatment” (period after the development of the infection). In this period, DGD was four times more common in males than in females (see table 4). Likewise, a statistical association (p-value <0.05) was observed between DGD and the follow-up period of the response to treatment, as it was seven times more common in males than in females (Table 4).

Table 4. Comparison by logistic regression between males and females in treatment period (weeks 8 and 10) and follow-up period (weeks 16 and 22), regarding microscopic DGD lesion occurrence.

Lesion type	Period	Associate d variable	Occurrences a	Odds ratio	CI 95% ^b	P value
DGD	Treatment	Female	2:14	0,21	0,08-0,43	
		Male	9:7	3,92	1,5-11,13	<0,05
	Follow-up	Female	5:11	0,17	0,03-0,56	
		Male	6:10	7,34	1,57-46,81	<0,05

Table NGD: Nodular granulomatous dermatitis. ^a Occurrences amounts ^{a,b} CI 95% = Confidence interval of quotient probability.

Fibrosing Dermatitis (FD): fibrous connective tissue extensive formation was observed, extending towards deep dermis and underlying muscle, accompanied by a mononuclear infiltration with lymphoplasmacytic predominance and histiocytic in a lesser amount. This lesion pattern was not statistically associated with gender or evolution time.

Fibrosis without inflammation (F): lesion characterized by formation of fibrous connective tissue without associated leukocyte infiltration. This lesion type was detected only in one infected female at week 10, therefore, due to low occurrence, no associations could be established.

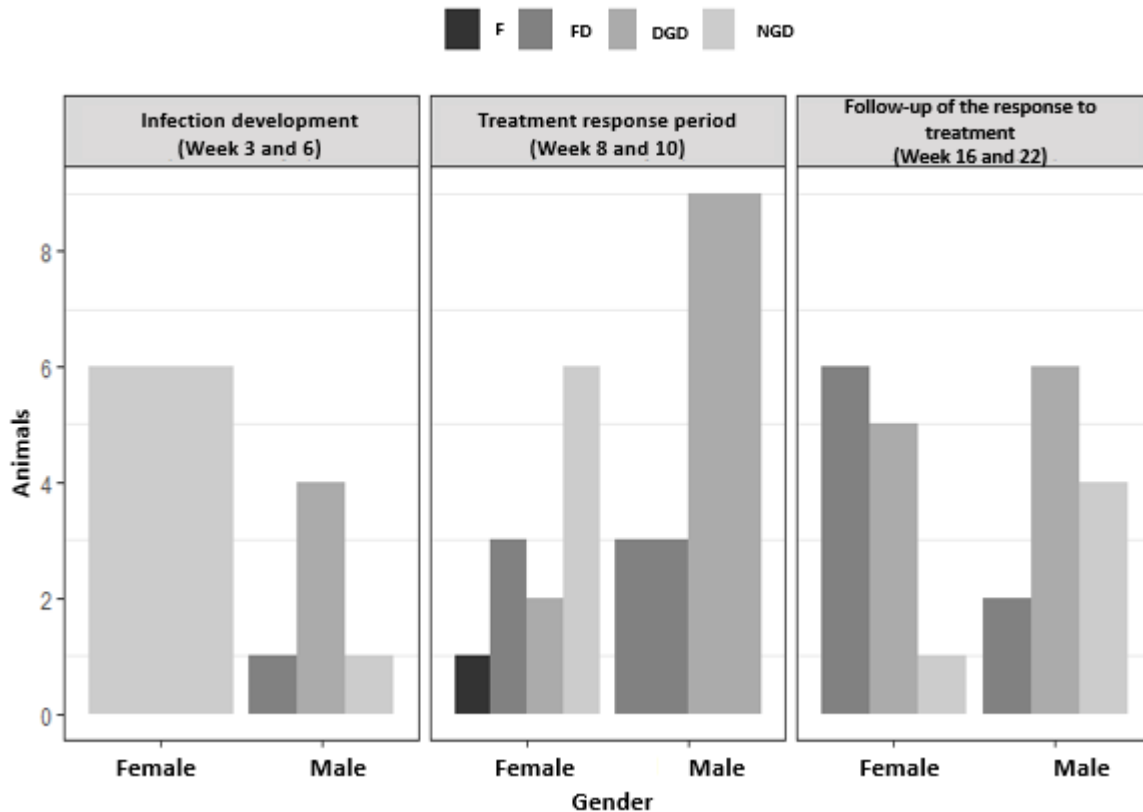


Figure 4. Presentation frequency of different microscopic lesions in animals throughout the trial. This figure represents microscopic lesions frequency in males and females throughout the trial. Note NFD and FD are more frequent in females, compared to males in which DGD is more frequent. *chi* square test was performed. P-value = 0.0135. F: fibrosis without injury. DF: fibrosing dermatitis. DGD: diffuse granulomatous dermatitis. NGD: nodular granulomatous dermatitis.

Discussion

In this research, evolution of anatomopathological aspects of infection by *L. braziliensis* after injection in golden hamster's last third of dorsal skin was evaluated besides its treatment with two products, also extracutaneous evaluation of different organs was carried out. In general, observed lesions were nodular, proliferative, ulcerative and granulomatous that evolved into fibrosing reparative processes with or without inflammation, this modelates what has been described in human beings (Handler et al.

2015; McGwire and Satoskar 2014; Saldanha et al. 2017). The microscopic lesions were also similar to those previously described in humans: exudative and necrotic granulomatous reaction, poorly defined and well defined granulomatous reaction, with presence of plasma cells, lymphocytes and histiocytes (Magalhães et al. 1986). Intense granulomatous inflammation observed histologically on hamster's dorsal skin is similar to what was reported in this species when inoculated in its paw skin (Gomes-Silva et al. 2013).

A histopathological classification was performed according to the lesion distribution pattern and its evolution as described by Kennedy (2016). This classification had not been described before in humans or in the disease hamster model, however, it allowed to establish that sex of the animal was associated with microscopic characteristics of skin lesion. This type of association had not been previously reported either in hamster or human. Females presented mainly NGD unlike males, in which the lesion was predominantly a diffuse granulomatous one. Isaza et al. (1996) reported a diffuse pattern of injury, while Diaz & Ferreira (2018) communicated a focal distribution, but without determining the occurrence of differences between sexes. This association in the hamster model suggests sex is a determining factor in cutaneous leishmaniasis anatomopathological and clinical evolution (Travi et al. 2002) and could be seen as a predictive factor of the disease clinical course. In this investigation it was evident that females treated with both compounds presented clinical cure at the end of the trial, unlike the males.

NDG predominance and better healing in females are probably related to sex hormone's role in immune response development. Estrogens have been described to induce a polarization of Th1 profile immune response, INF gamma and IL-2 production participate in the activation of infected macrophages to increase their microbicidal capacity, the formation of granuloma and consequently a primacy of cellular immunity. Males have a greater susceptibility to infection due to high expression of Th2 profile cytokines, such as IL4, IL-5 and IL-10, this generates less protection against intracellular microorganisms and causes significantly more severe clinical lesions (Agudelo and Robledo, 2000); (Travi et al. 2002). Granuloma generates a more efficient containment of intracellular



microorganisms as has been observed during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. In this disease, the presence of granuloma is a protective indicator, while its absence is related to chronic disease state and increased infection severity (Saunders, Frank, and Orme, 1999). This observation suggests that NDG development in hamsters could be a prognostic factor to use in cutaneous leishmaniasis clinical evolution. Further studies are needed in this regard.

Presence of circumscribed lamellar basophilic material, Schaumann's bodies, was observed in animals of both sexes, this have been described by other authors in the hamster model (Gomes-Silva et al. 2013; Laurenti et al. 1990). These structures, also observed in infection by agents such as *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma duboisii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Blastomyces dermatitidis*, have been related to a deficiency in phagocytic macrophage system (Laurenti et al. 1990). Schaumann's bodies have been described in humans and hamsters, but have not been reported in other animal species used as animal models for leishmaniasis research (Essayag et al. 2002).

In response to the treatments, it was observed a higher percentage of animals showing cicatrization were treated with Glucantime®, compared to those treated with Alyeyuba. As mentioned above, Glucantime® is the standard treatment for leishmaniasis; its action mechanism is associated with direct toxic effect on the parasite, acting as a prodrug transformed into a more toxic trivalent molecule (Sb III) inside infected macrophage's parasitophorous vacuole (Ouellette, Drummel-Smith, and Papadopoulou 2004). The toxic effect is caused by DNA fragmentation and subsequent activation of apoptosis, accountable for side effects in patients (Sereno et al. 2001). The unconventional Alyeyuba treatment is an extract of *Caesalpinia spinosa*, a plant used in traditional medicine to treat inflammatory conditions, as well as wound and ulcer management (Callohuari, Sandoval and Huamán, 2017). This compound is in the development phase and its mechanism of action is still unknown. Although Glucantime® had a better effect, greater and earlier healing, there was parasite persistence and extracutaneous dissemination to lymphoid



organs, as well as cardiac and pancreatic toxic changes, in contrast to Alyeyuba, which did not present toxic effects in any evaluated animals.

In the present study, cure percentage of animals treated with Alyeyuba was 50% (3/6) at the end of the trial, in contrast to a previous study in hamster in which achieved cure percentages were: 83% with Alyeyuba cream and 100% with Alyeyuba topical lotion, as well as seven human patients with uncomplicated leishmaniasis, treated with same compound, who showed a complete clinical cure 45 days after finishing treatment, without any side effects (Robledo et al. 2017). This difference in results could be due to the therapeutic follow-up period, since the present study lasted 22 weeks, therefore the trial ended three months after completing the treatment. A longer duration allowed for a longer follow-up compared to the cited trial. Comparison of these investigations suggests that ulceration's clinical healing was achieved in the previous study and probably reinfection occurred later.

Evaluation of parasitological load evaluation and type of lesions in response to both treatments using quantification by q RT-PCR and histopathological analysis, respectively, proved there is no statistical association between the parasitological load and different histopathological findings described in the present study. It is worth noting that when infection developed (week 6) no parasites were detected by RT-PCR, unlike the treatment response follow-up phase (week 22) in which different parasite loads were detected. This difference can be explained due to where the skin sample was recollected, the skin tissue used for histopathology was obtained from the center of the ulcerated lesion, a place where parasitological load is greater with respect to the active edges as previously reported (Ramirez et al. 2000; Suárez et al. 2015). This suggests that parasitological load is not related lesion level in accordance to observations by other authors (Silva et al. 2016) (Saridomichelakis et al. 2007); furthermore, no association between both tests for parasite quantity assessment in tissue can be concluded (Ríos et al, 2012).

Although in some animals clinical cure of cutaneous lesions was observed, they did not present a parasitological cure, since there were post-treatment amastigotes in their skin.

In these animals the infection could be reactivated if concomitant immunosuppressive conditions are present as already reported in humans (Montenegro-Idrogo et al. 2014).

In the liver and spleen of infected animals, parasitological loads in heterogeneous numbers were detected. These loads had no statistical relationship with other variables and were absent at week 22 in both organs, this can be explained by parasitic elimination by the host's immune system in chronic stages of the disease (Press, 2016).

The detection of parasites in the liver and spleen during infection establishment (weeks 3 and 6) indicates transportation of *L. braziliensis* to extracutaneous tissues. Extracutaneous location of *L. braziliensis* confirmed by RT-qPCR, indicates this species, although having preferential cutaneous tropism, can enter circulation through dermal vascular plexus transported by infected macrophages and, once there, generate parasitaemia as previously documented (Silva et al. 2016). It is then taken to regional lymph nodes, where the specific antigenic presentation is made to the T cells and, from there, it passes to the spleen and liver. This location in organs of the reticuloendothelial system could also be associated with the high inoculum loads used in the trial (Rey et al. 1990).

Conclusion

This is the first study to characterize the evolution of anatomopathological lesions related to *L. braziliensis* infection in the hamster model, inoculated in the last third of the dorsal skin. Macroscopically, a nodule developed in the first weeks after infection, it evolved to a ulcerocrusted lesion and later formed a scar. Microscopically, mixed pyogranulomatous leukocyte infiltrations were observed with two distribution patterns: diffuse and nodular, which progressed to fibrosing dermatitis of the reparative type.

Regarding the clinical evolution of the disease, all animals treated with Glucantime® presented clinical cure at the end of the trial, unlike animals treated with Alyeyuba, since



two of them presented failure and one of them presented improvement. No drug generated parasitological cure.

With Glucantime®, lesions that have been previously described as having toxic nature were identified, in the myocardium and in pancreas. With topical treatment with alyeyuba no toxic effects were observed in animals.

In the present study, the spread of the species *L. braziliensis* to extracutaneous tissues, such as liver and spleen, was detected in the phase of infection establishment, without evidence of associated clinical signs, but they were not found at week 22, a period in which the test was ended.

This research contributes to a better understanding of *L. braziliensis* infection pathogenesis in Golden Hamster, an experimental model that represents pathological lesions development of the disease in humans. This model reproduces tissue evolution and temporal evolution of the lesional situation in affected humans.

The last third of the dorsal skin of the animal turns out to be a suitable region to continue with future research, since it allows development of characteristic lesions of infection, without affecting vital activities such as movement and feeding, improving the well-being of the animals.

This research allowed to identify some trends regarding clinical evolution (cure, improvement, failure) with sex and type of treatment, which could have predictive value of the evolution of the disease in this experimental model. According to what is shown here, females that develop circumscribed NGD without the presence of exudation will have a greater probability of cure.

9. Conclusiones generales.

Este es el primer estudio que caracteriza la evolución de las lesiones anatomopatológicas relacionadas con la infección por *L. braziliensis* en el modelo Hámster, inoculado en el último tercio de la piel del dorso. Macroscópicamente se desarrolló un nódulo en las primeras semanas postinfección, que evolucionó a una lesión ulcero costrosa y posteriormente a la formación de una cicatriz. Microscópicamente se observaron infiltraciones leucocitarias mixtas piogranulomatosas con dos patrones de distribución: difuso y nodular que progresaron a una dermatitis fibrosante de tipo reparativo.

Respecto a la evolución clínica de la enfermedad, todos los animales tratados con Glucantime® presentaron cura clínica al finalizar el ensayo, a diferencia de los animales tratados con Alyeyuba, ya que dos de ellos presentaron falla y uno de ellos presentó mejora. Ningún medicamento generó cura parasitológica.

Con Glucantime® se identificaron lesiones que se han descrito previamente como de naturaleza tóxica, tanto en el miocardio como en el páncreas con respecto (Henao et al., 2004; Lyra et al., 2016) . Con el tratamiento tópico con alyeyuba no se observaron efectos tóxicos en los animales.

En el presente estudio se detectó la diseminación de la especie *L. braziliensis* a tejidos extracutáneos como hígado y bazo en la etapa de establecimiento de la infección, sin evidencia de signos clínicos asociados, pero no se encontraron en la semana 22, periodo en el que finaliza el ensayo.

Esta investigación contribuye a un mejor entendimiento de la patogenia de la infección por *Leishmania braziliensis* en el Hámster dorado, un modelo experimental que representa el desarrollo de las lesiones anatomopatológicas de la enfermedad en el humano. Este modelo reproduce la evolución tisular y temporal del cuadro lesional de la enfermedad humana.

El último tercio de la piel del dorso del animal resulta ser un sitio adecuado para continuar con futuras investigaciones, ya que permite el desarrollo de las lesiones características



de la infección, sin afectar actividades vitales como el desplazamiento y la alimentación, mejorando el bienestar de los animales.

10. Anexos.

Evolución de las lesiones anatomopatológicas en machos y hembras durante todo el experimento. Las lesiones histológicas en cada figura corresponden al espécimen macroscópico

Periodo de Infección (semanas 3 y 6)

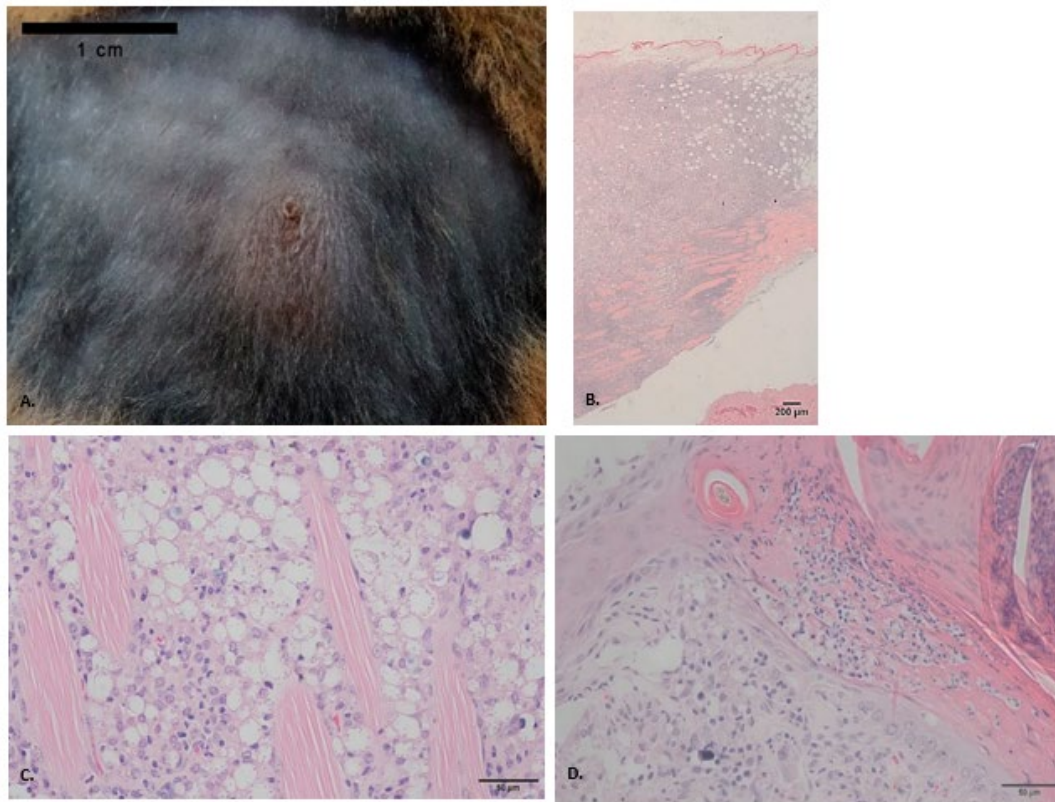


Figura 8. Semana 3, piel de hembra. DX: dermatitis granulomatosa nodular (DGN). A. Macrofotografía. Lesión nodular focal, oval, de bordes bien delimitados, levemente eritematosa, firme al tacto, inmóvil, con costra levemente levantada. B. Microfotografía. Dermis y músculo. Infiltrado leucocitario extenso, circunscrito. H-E 100X C. Microfotografía. Dermis profunda. Detalle del infiltrado, constituido principalmente por macrófagos activados con múltiples amastigotes intracitoplasmáticos. H-E 400X. Diagnóstico: dermatitis granulomatosa nodular. D. Microfotografía. Epidermis. Hiperqueratosis paraqueratósica, pústula, formación de costra. H-E 400X.

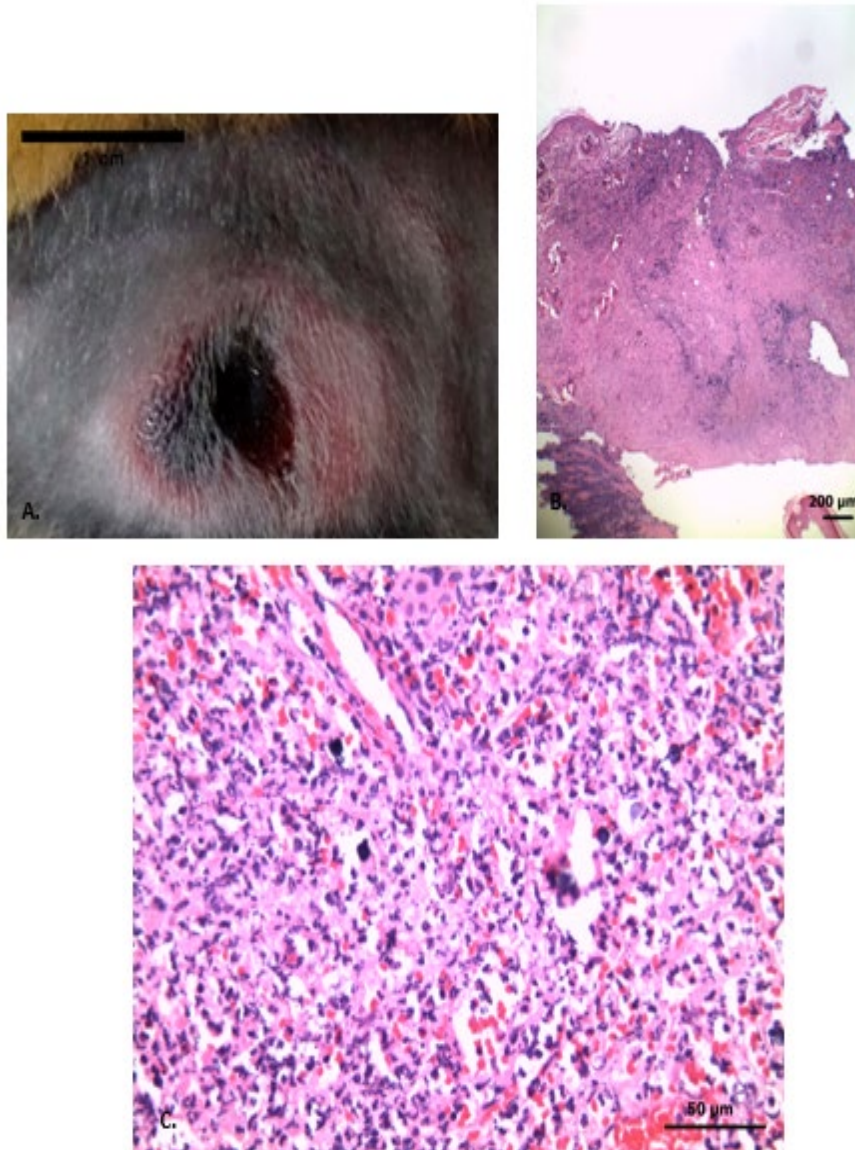


Figura 9. Semana 3, piel de Macho. DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD) A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, inmóvil, redondeada, cóncava, firme, color rojo oscuro, de bordes engrosados y eritematosos con un área negra central. B. Microfotografía. Ulceración extensa. En la dermis se evidencia infiltrado leucocitario difuso profundo. H-E 100X. C. Microfotografía. Dermis. Infiltrado leucocitario con predominio de neutrófilos. Adicionalmente Se logran apreciar depósitos de un material basófilo laminar de distribución multifocal en cantidad moderada (cuerpos de schcaumann). H-E 400X

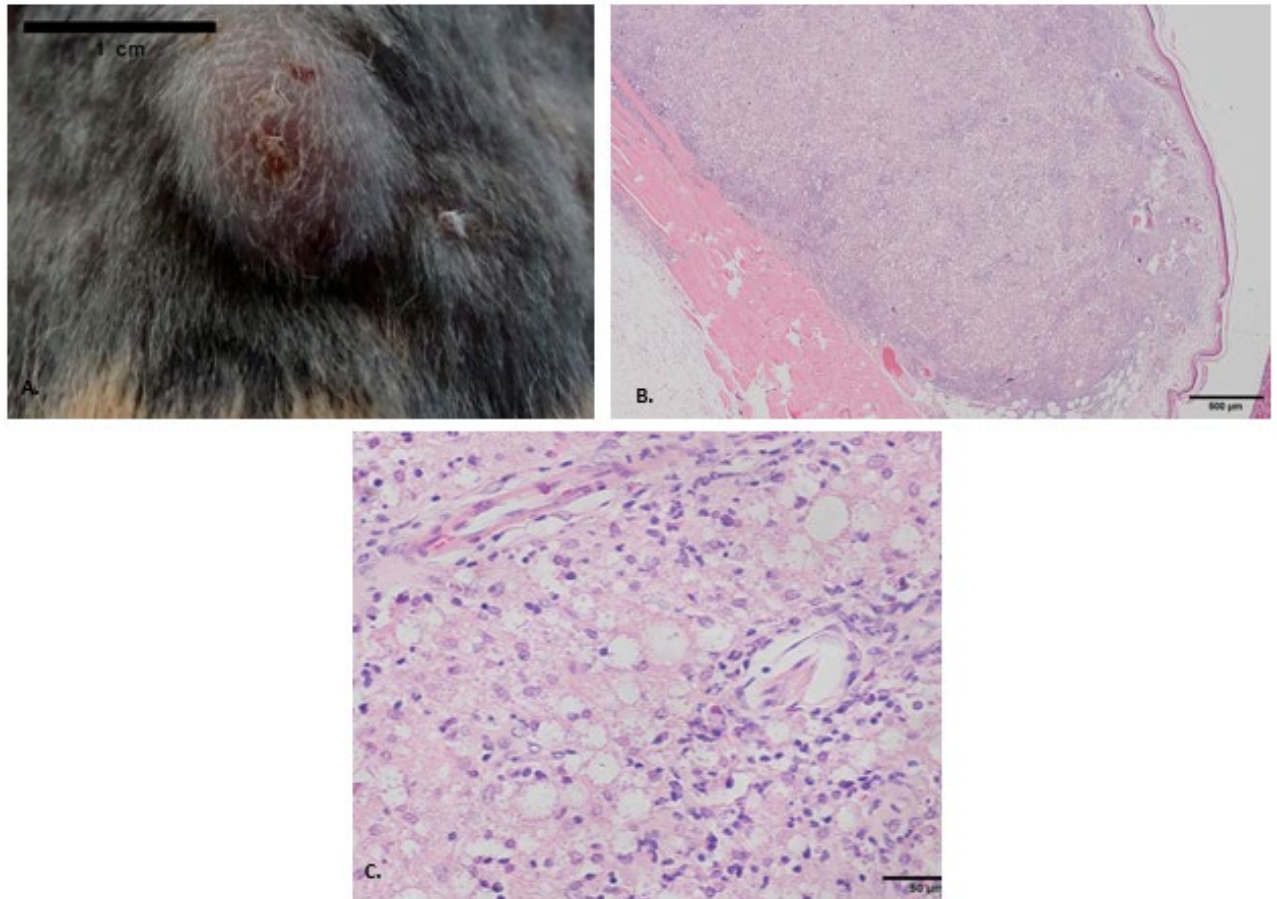


Figura 10. Semana 6, piel de hembra DX: dermatitis granulomatosa nodular (DGN). A. Macrofotografía. Nódulo inmóvil, firme, levemente eritematosa inmóvil, con costras. Tiene un área rojiza central levemente deprimida B. Microfotografía. Dermis. infiltrado leucocitario mixto severo y profundo, de distribución focal. Hiperqueratosis ortoqueratósica leve en epidermis H-E 100X. Microfotografía. Dermis, detalle del infiltrado, constituido principalmente por macrófagos activados con numerosos amastigotes intracitoplasmáticos. En menor cantidad se aprecian neutrófilos, algunas células epitelioides y escasos linfocitos H-E 400X.

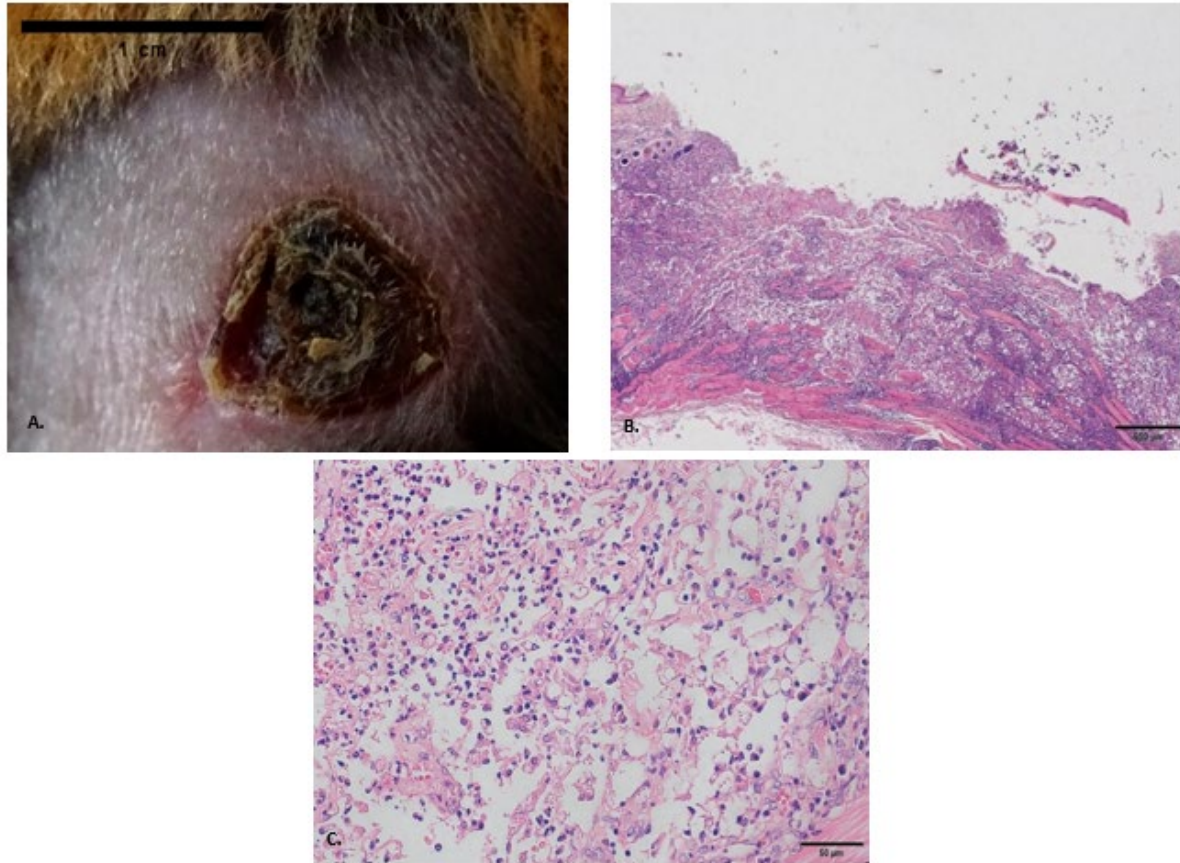


Figura 11. Semana 6, piel de macho. DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, cóncava, con bordes levemente retraídos, firme al tacto e inmóvil, que presenta una costra firmemente adherida de superficie irregular, color oscuro. **B. Microfotografía.** Úlcera extensa. En la dermis se evidencia un infiltrado leucocitario mixto difuso profundo. H-E 100x. **C. Microfotografía.** Dermis. Detalle del infiltrado, constituido principalmente por neutrófilos, macrófagos activados y en menor cantidad por células epitelioides, linfocitos y plasmocitos. Presencia de amastigotes intracitoplasmáticos y libres H-E 400x.

Tratamientos.

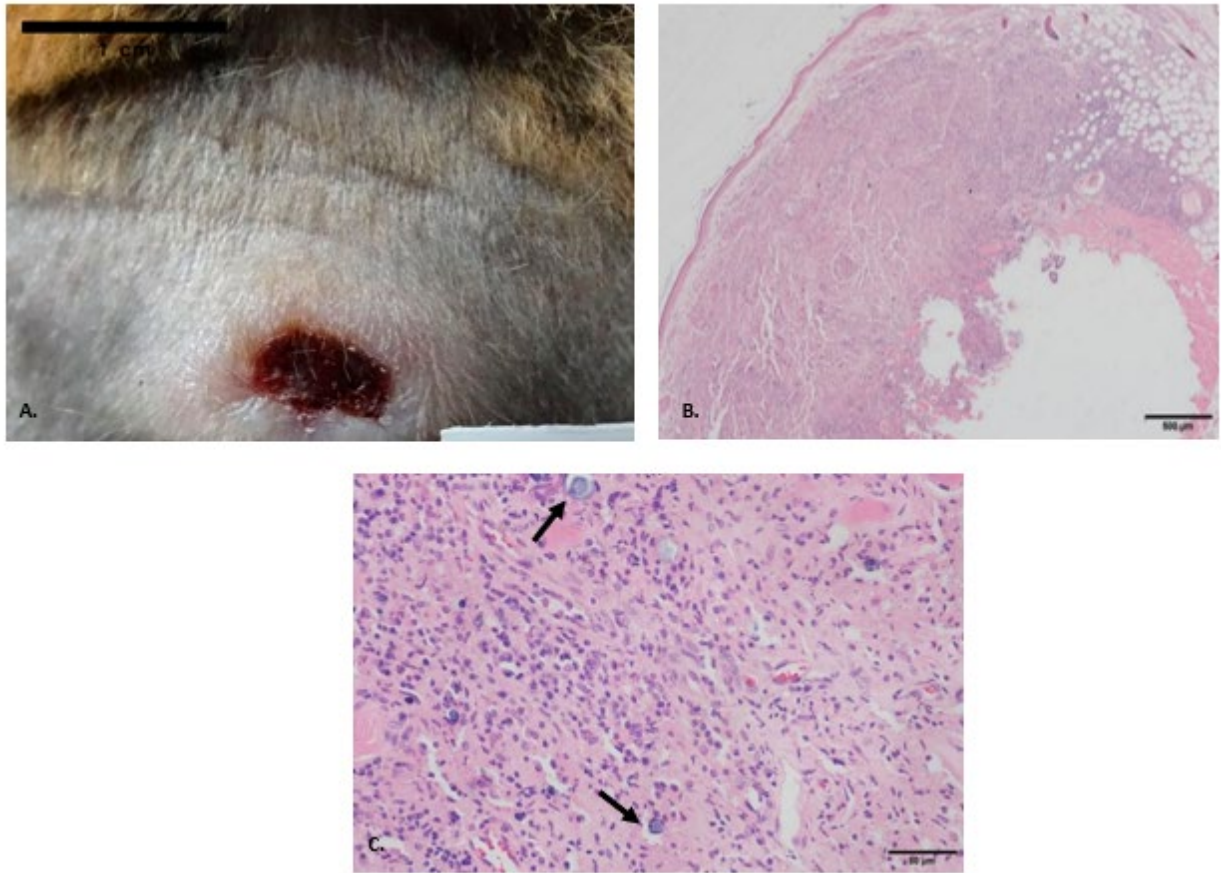


Figura 12. Semana 8, piel de hembra (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa nodular (DGN). A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, cóncava, ovoide, firme al tacto e inmóvil, de bordes retraídos, costrosa, color rojizo oscuro. B. Microfotografía. Dermis. infiltrado leucocitario mixto severo, de distribución focal. Hiperqueratosis ortoqueratósica leve en epidermis H-E 100X. C. Microfotografía. Dermis, detalle del infiltrado, constituido principalmente por células epitelioides, células gigantes multinucleadas tipo *Langhans* y en menor proporción, neutrófilos y linfocitos. Neovascularización multifocal moderada. Depósitos de un material basófilo laminar concéntrico de distribución multifocal en cantidad moderada (cuerpos de shcaumann) (ver flecha) y fibroblastos hipertróficos cantidad leve H-E 400x.

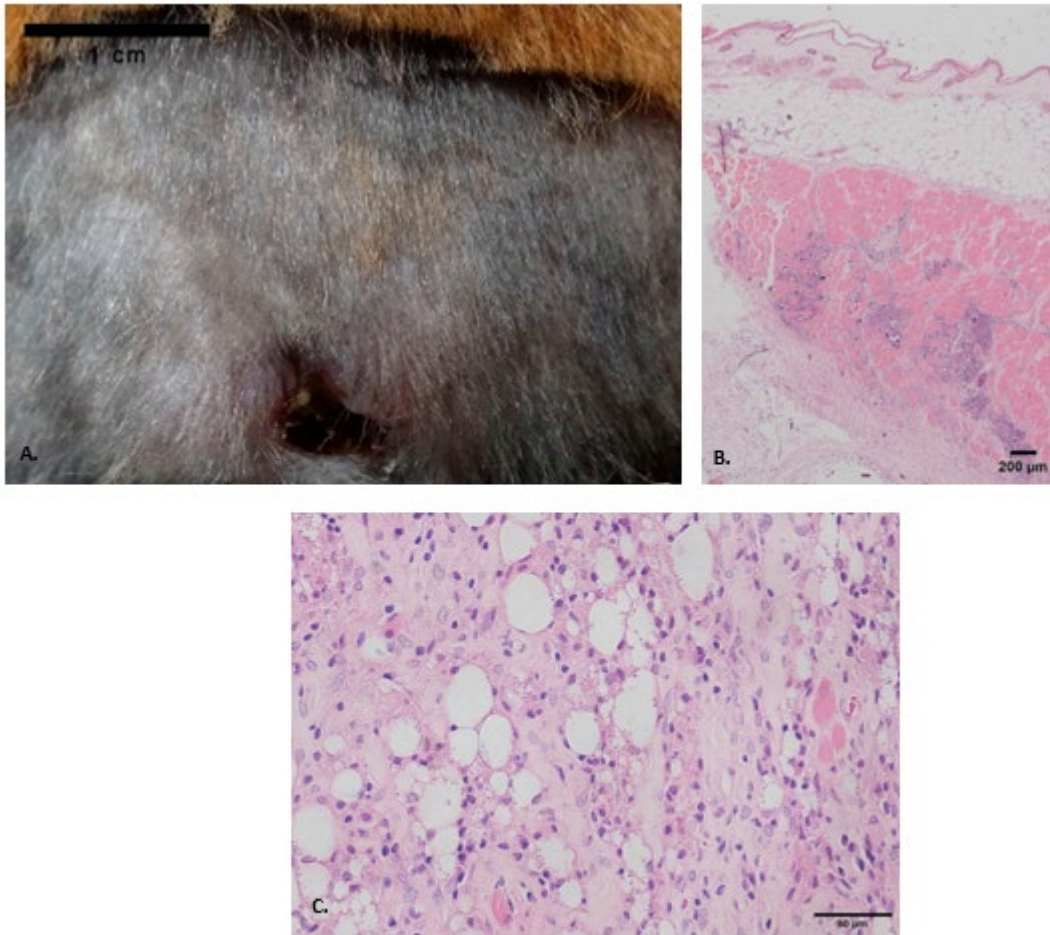


Figura 13. Semana 8, piel de hembra (Glucantime) A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, cóncava, de forma irregular, firme al tacto e inmóvil, costrosa. B. Microfotografía. Dermis y músculo. infiltrado leucocitario severo, de distribución focal. Hiperqueratosis ortoqueratósica leve. La superficie epidérmica se observa irregular H-E 100x. C. Microfotografía. Dicho infiltrado está constituido principalmente por macrófagos activados con numerosos amastigotes intracitoplasmáticos. En menor cantidad se observan linfocitos. Se aprecian fibroblastos hipertróficos en cantidad leve H-E 400x.

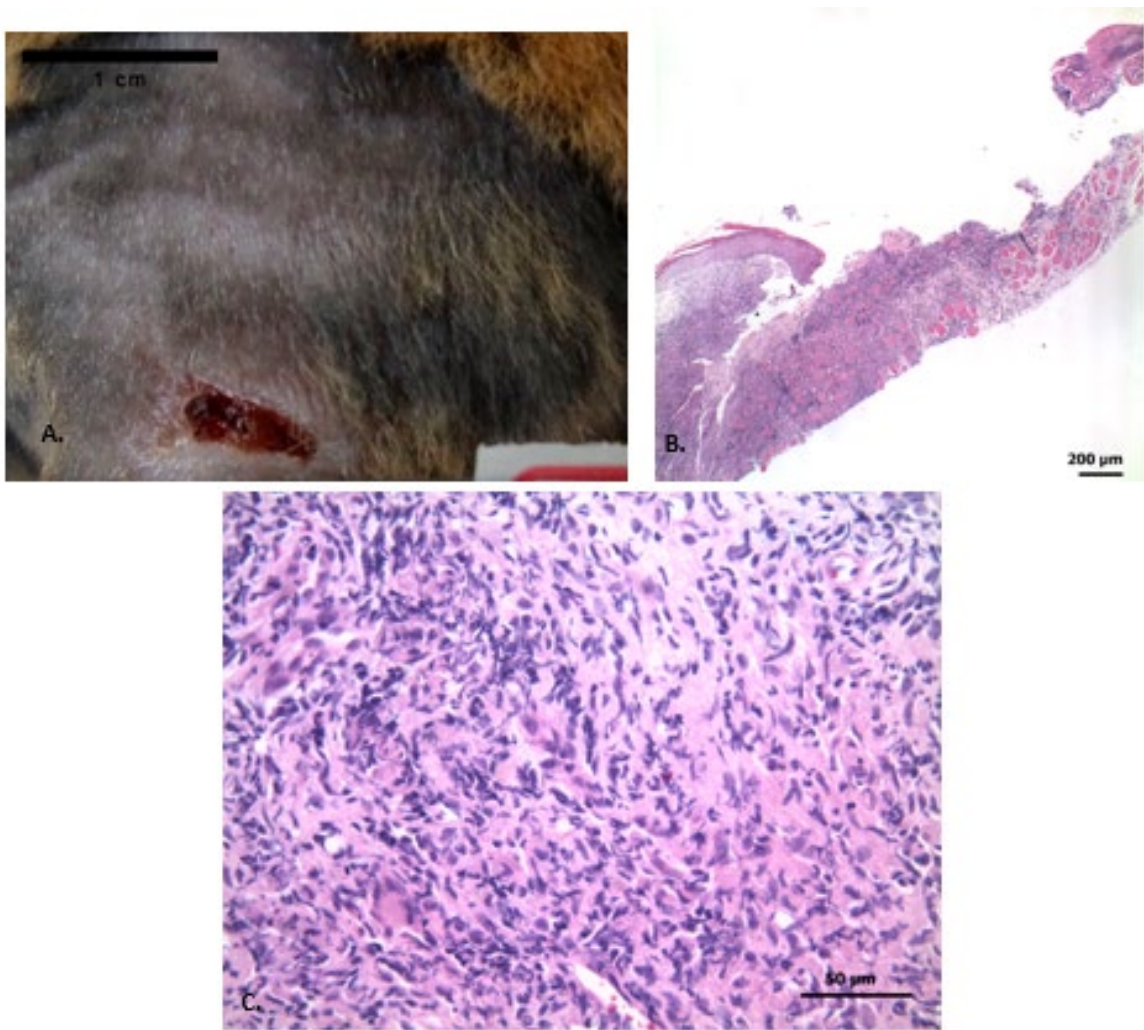


Figura 14. Semana 8, piel de macho (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, cóncava, de forma ovoide, firme al tacto e inmóvil, bordes moderadamente retraídos, de apariencia costrosa, color rojizo oscuro. B. Microfotografía. Dermis y músculo. úlcera extensa, se evidencia un infiltrado leucocitario mixto severo de distribución difusa. Hiperplasia regular de la epidermis e hiperqueratosis ortoqueratósica moderada. Formación de una costra H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis, detalle del infiltrado, constituido principalmente por neutrófilos y células epitelioides H-E 400x.

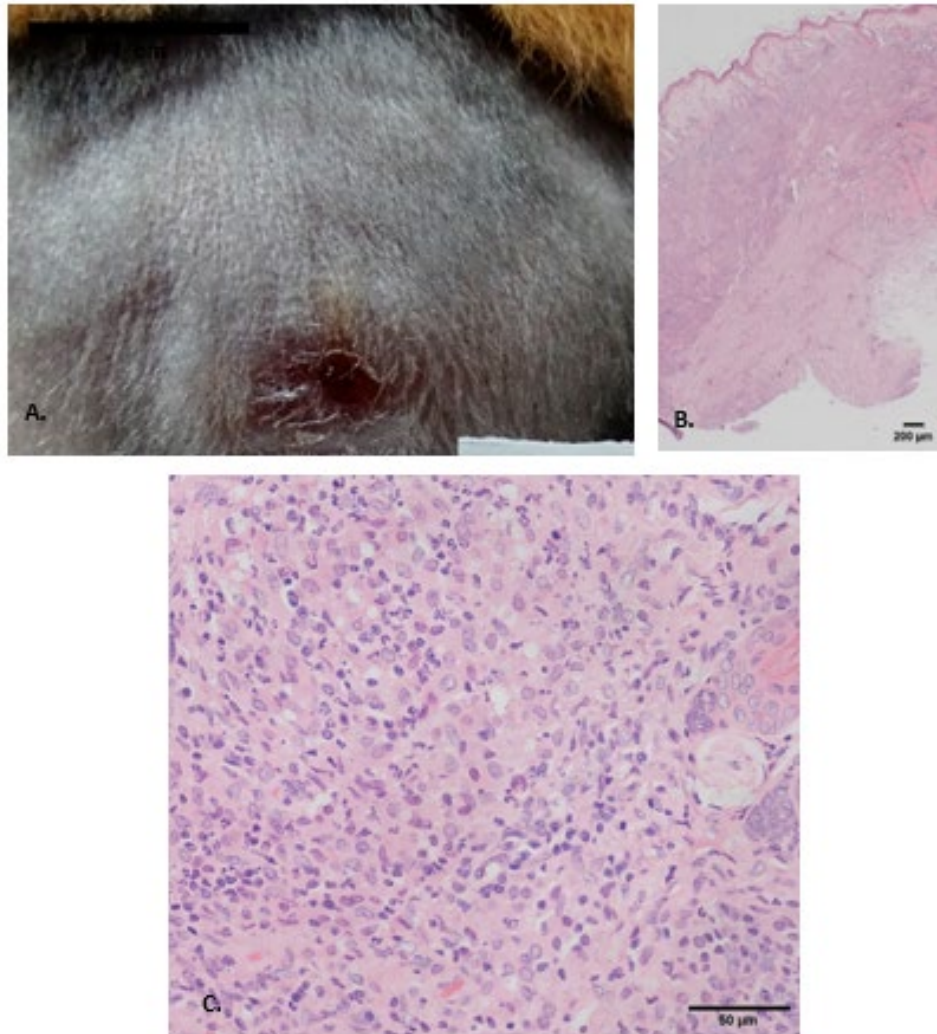


Figura 15. Semana 8, piel de macho (Glucantime). DX: Dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, levemente deprimida, de forma irregular, firme al tacto e inmóvil, costrosa de color rojizo. B. Microfotografía. Dermis y Músculo. Infiltrado leucocitario mixto severo de distribución difusa. Fibrosis focal extensa profunda H-E 100x. C. Microfotografía de la dermis. Detalle del infiltrado, constituido principalmente por neutrófilos y células epitelioides. Adicionalmente se observan fibroblastos hipertróficos en cantidad moderada H-E 400x.

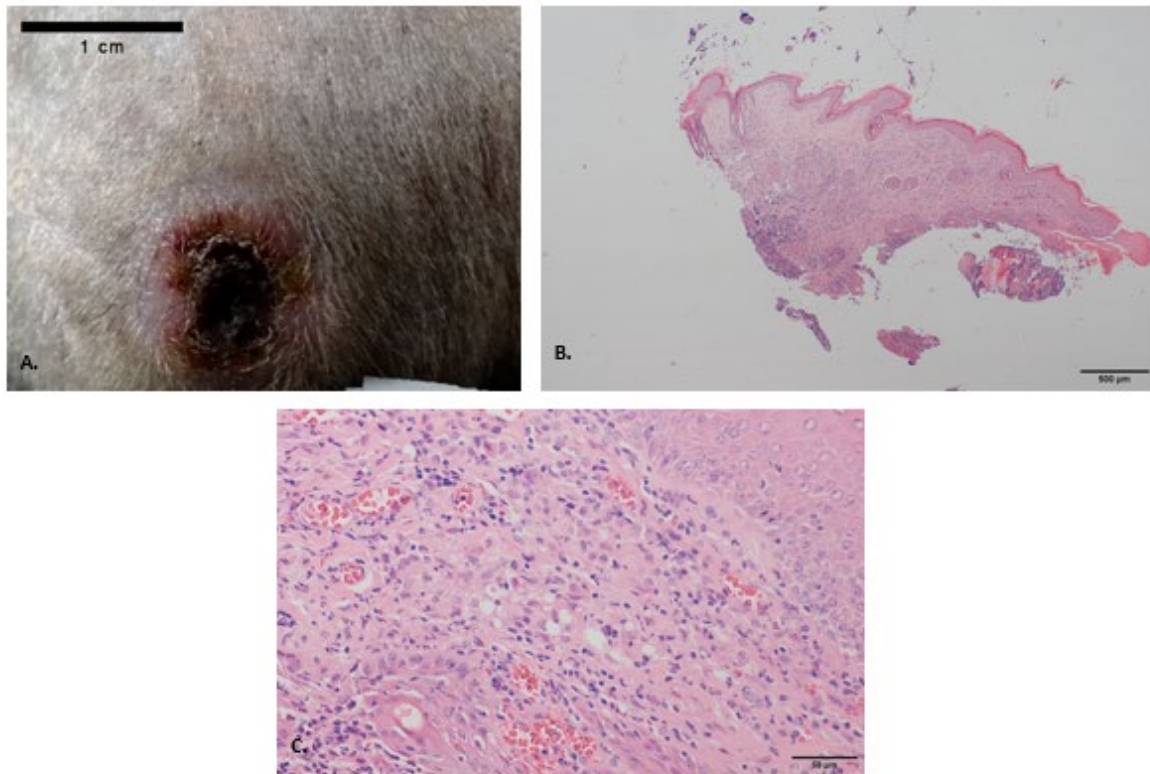


Figura 16. Semana 10, piel de hembra (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. Lesión focal ulcerativa, cóncava, de forma oval, con bordes retraídos y eritematosos, firme al tacto e inmóvil, que presenta una costra central firmemente adherida, de superficie irregular, coloración negruzca. B. Microfotografía. Dermis. Infiltrado leucocitario mixto severo, de distribución difusa. Hiperplasia regular de la epidermis e hiperqueratosis ortoqueratósica leve H-E 100x. C. Microfotografía Detalle del infiltrado, Constituido principalmente por, macrófagos activados con escasos amastigotes intracitoplasmáticos, algunas células epitelioides y neutrófilos. Hay neovascularización multifocal moderada. Adicionalmente se observa fibrosis discreta H-E 400x.

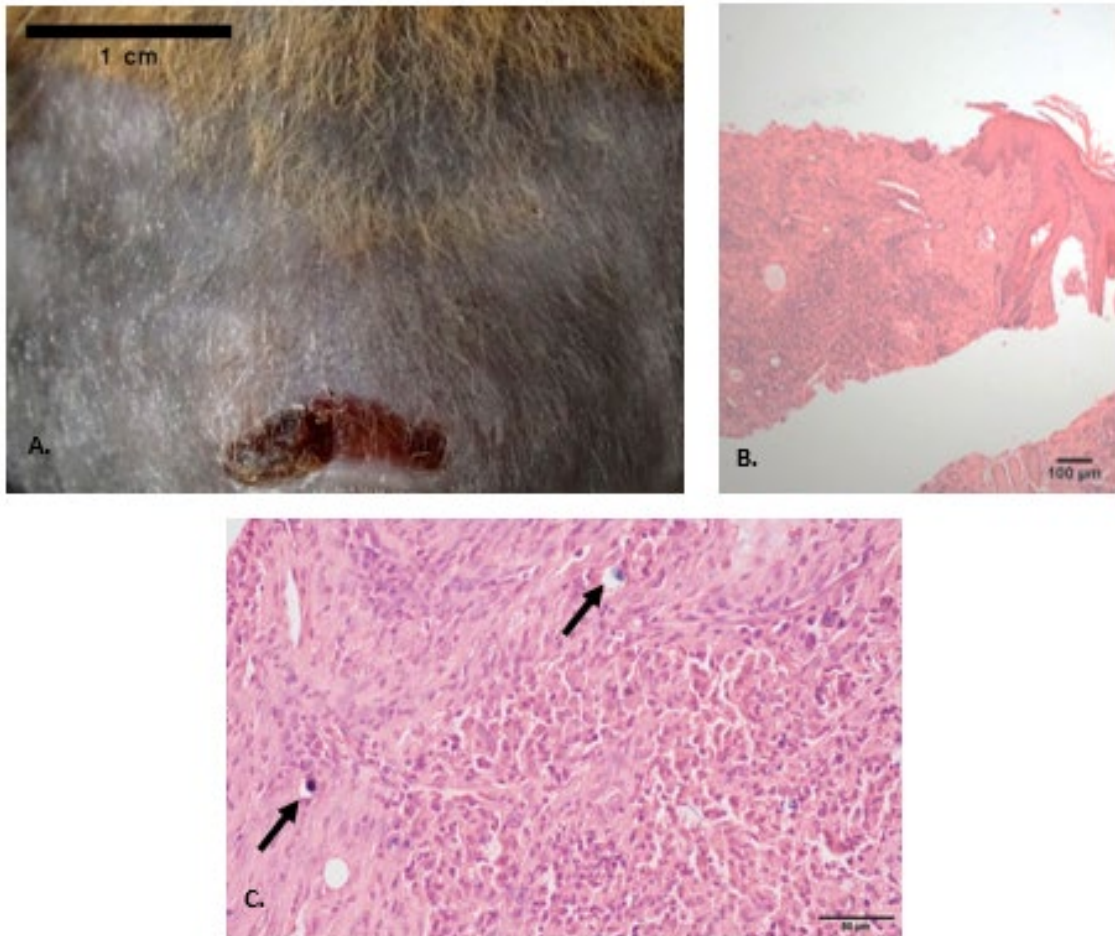


Figura 17. Semana 10, piel de hembra (Glucantime). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. Úlcera cóncava, de forma ovoide, bordes moderadamente retraídos, firme al tacto, inmóvil y costrosa, color rojizo oscuro, B. Microfotografía. Úlcera extensa. En dermis, Infiltrado leucocitario mixto severo de distribución difusa. Hiperplasia irregular de la epidermis e hiperqueratosis ortoqueratósica moderada H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis, detalle del infiltrado, constituido principalmente por macrófagos células epitelioides. Se aprecia fibrosis multifocal moderada, así como depósitos de un material basófilo laminar concéntrico de distribución multifocal en cantidad leve (cuerpos de shcaumann) (ver fechas) H-E 400x.

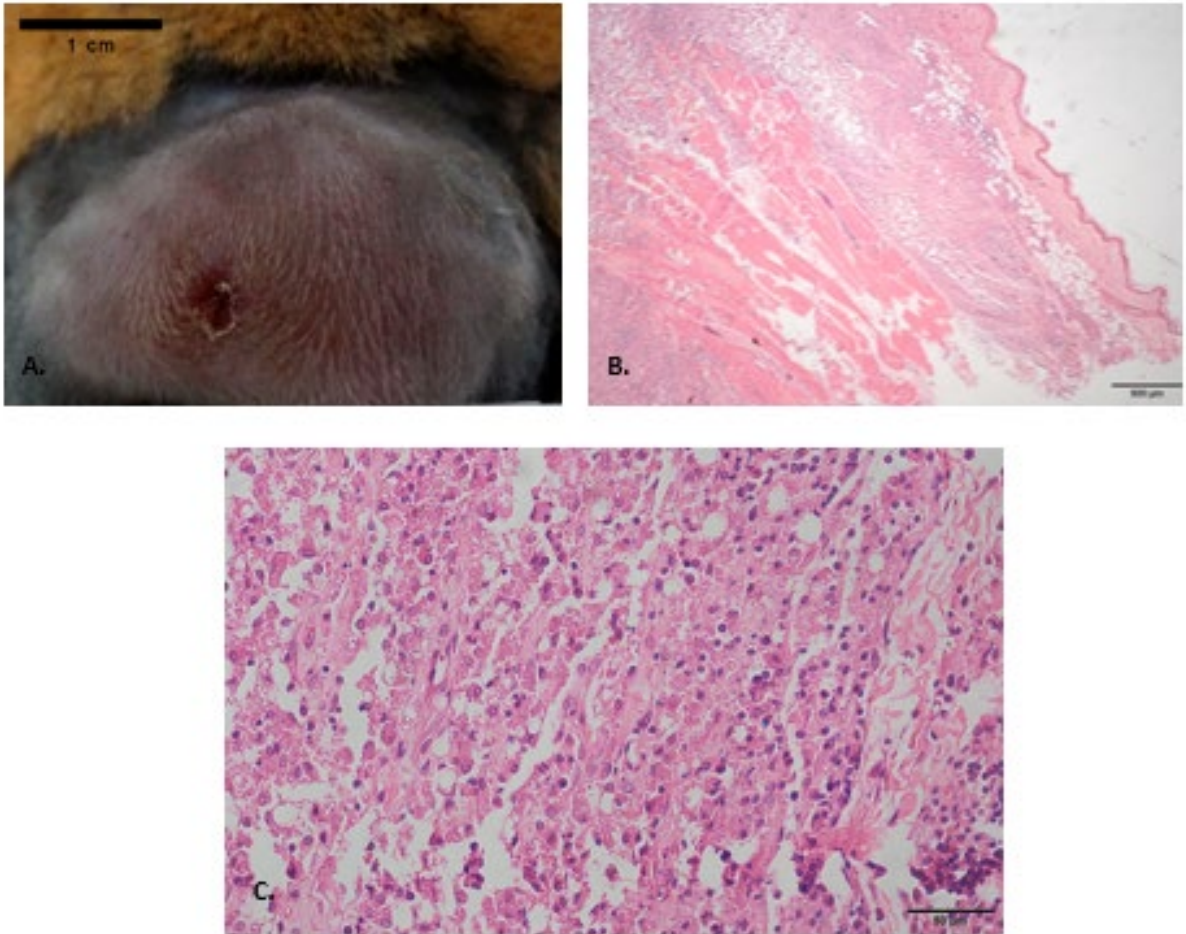


Figura 18. Semana 10, piel de macho (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD) A. Macrofotografía. Lesión nodular irregular, levemente ulcerada y costrosa, eritematosa, de consistencia semiblanda e inmóvil. B. Microfotografía. Dermis y músculo. Infiltrado leucocitario mixto severo de distribución difusa H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis profunda. Detalle del infiltrado, constituido principalmente por macrófagos activados con numerosos amastigotes intracitoplasmáticos, en menor proporción por células epitelioides H-E 400x.

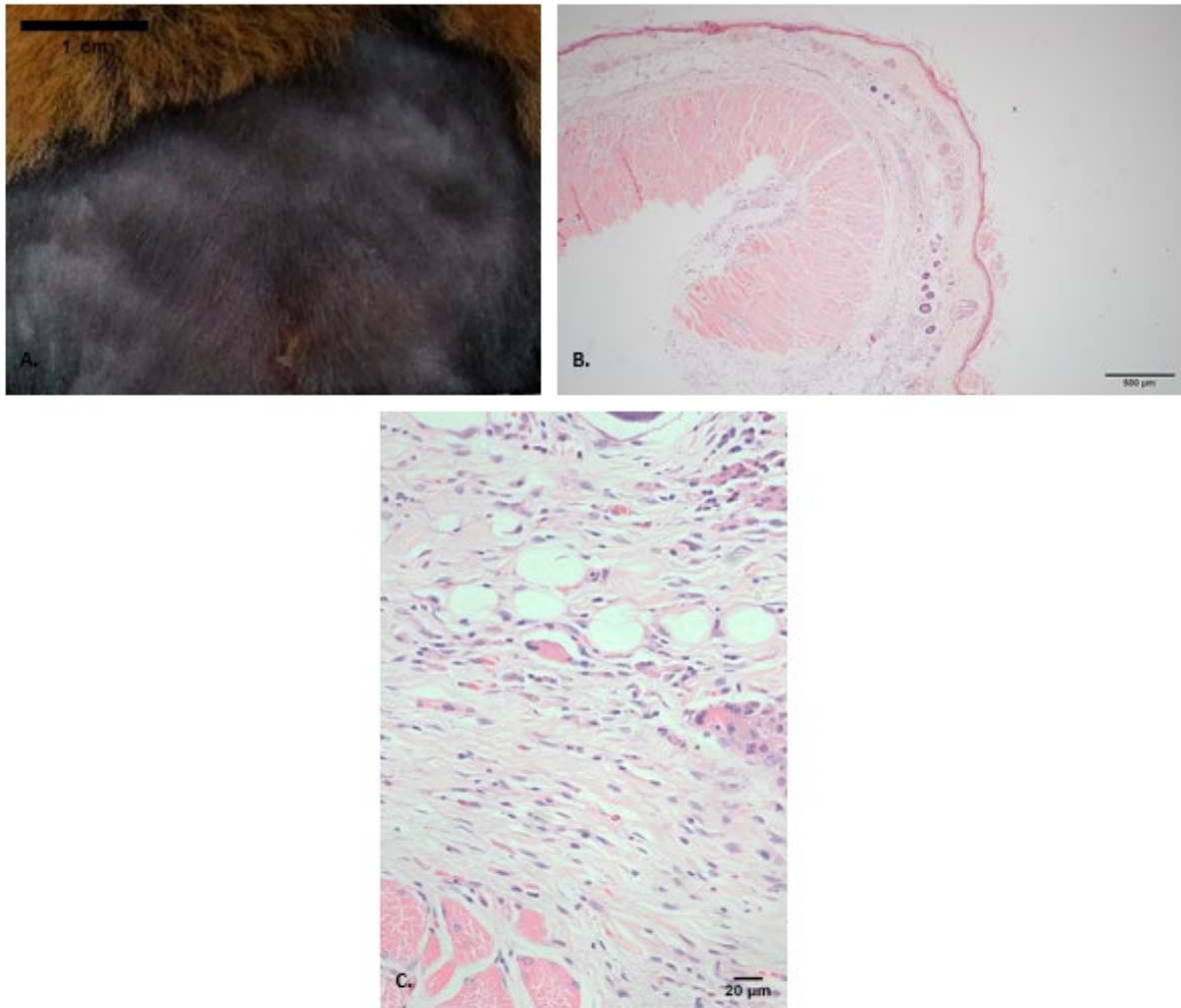


Figura 19. Semana 10, piel de macho (Glucantime). DX: dermatitis fibrosante (DF). A. Macrofotografía. cicatriz focal levemente deprimida, irregular, de apariencia costrosa, superficie irregular, color rojizo pálido firme al tacto e inmóvil. B. Microfotografía. Dermis. se observa fibrosis moderada en la dermis superficial y profunda H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis profunda y músculo, infiltrado leucocitario mixto constituido por linfocitos, plasmocitos y escasas células multinucleadas H-E 400x.

Seguimiento de la respuesta a los tratamientos.

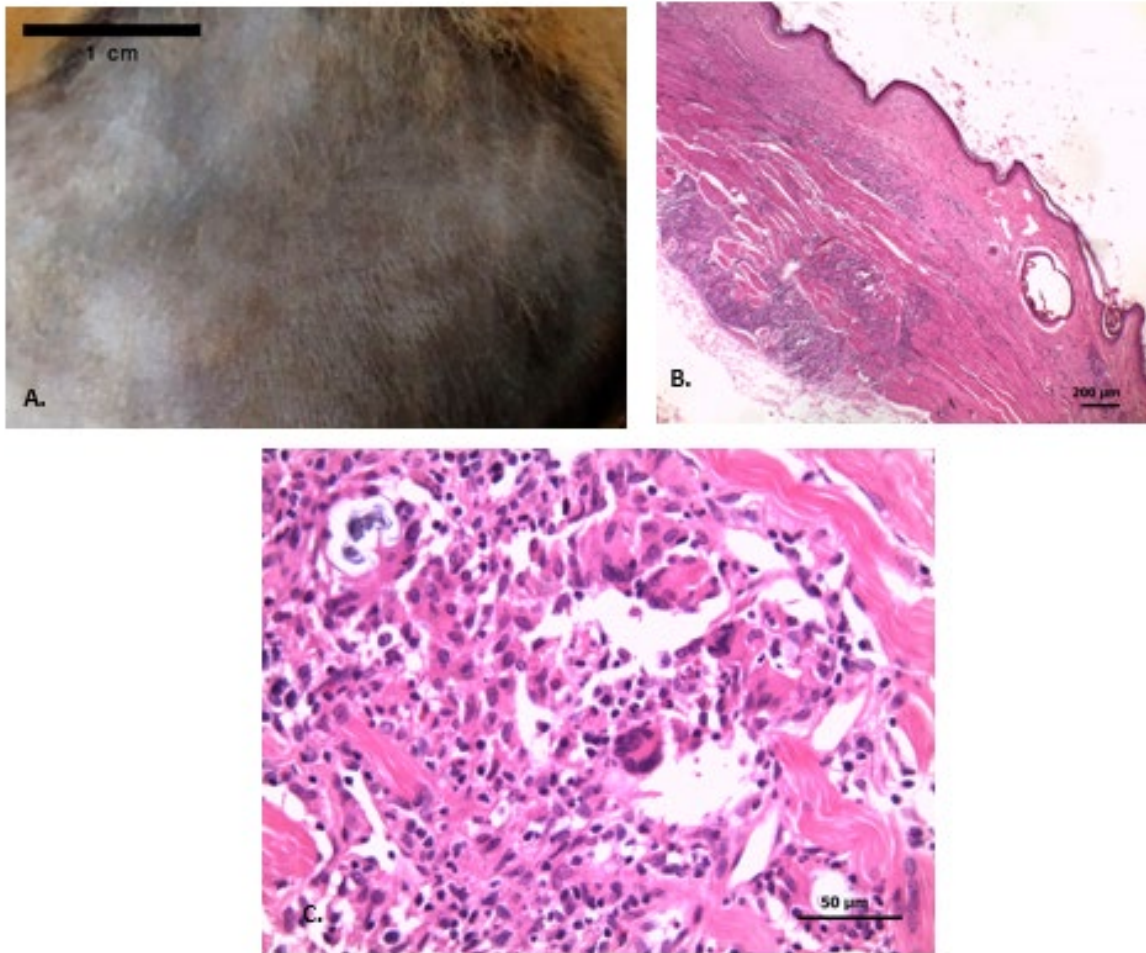


Figura 20. Semana 16, piel de hembra (Alyeyuba). DX: dermatitis fibrosante (DF). A. Macrofotografía. Sin lesiones significativas. B. Microfotografía. Dermis y músculo. Infiltrado leucocitario mixto moderado, de distribución focal. Fibrosis extensa. H-E 100x. C. Microfotografía. Detalle del infiltrado, constituido principalmente por células gigantes multinucleadas tipo *Langhans* y células epitelioides H-E 400x.

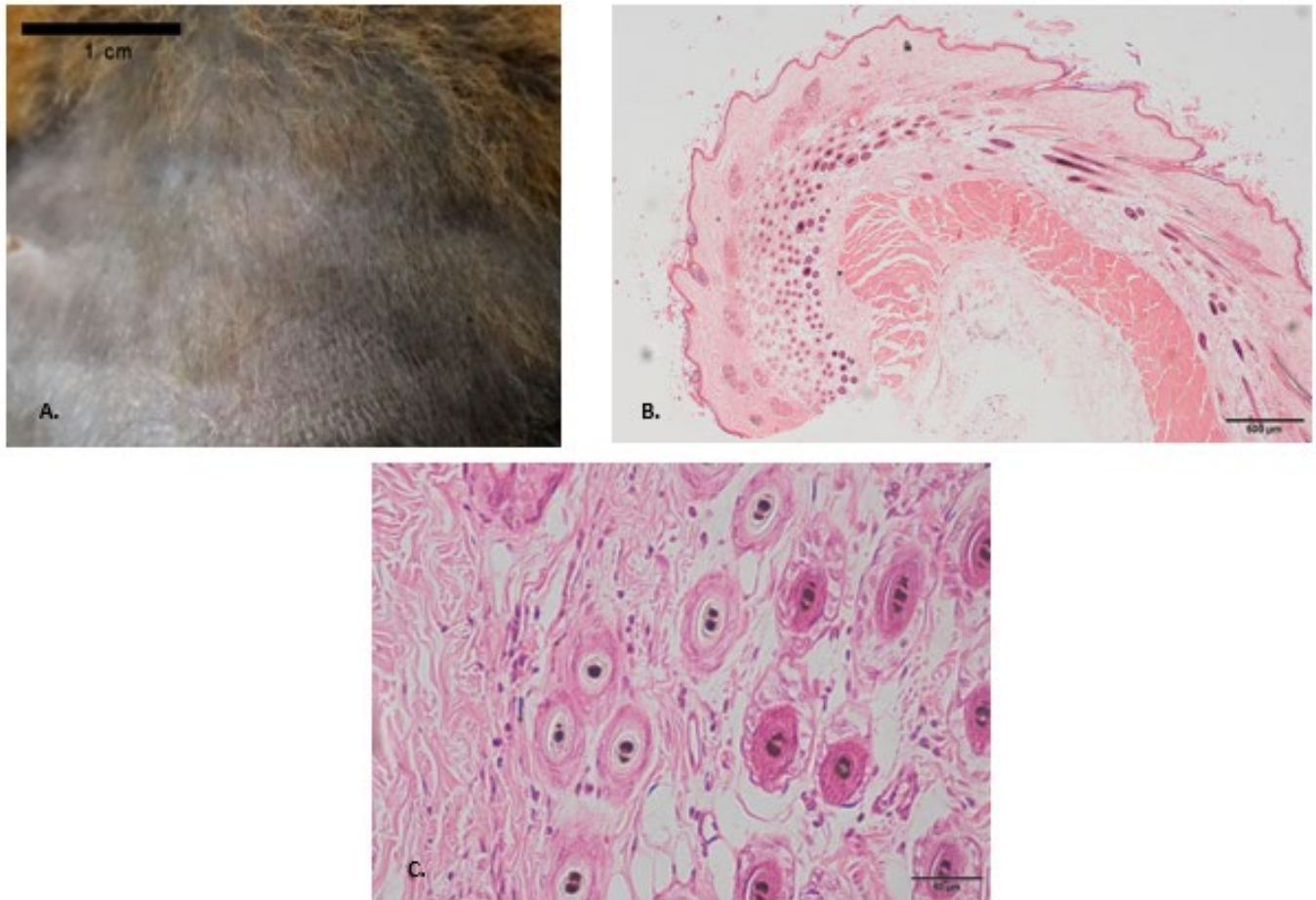


Figura 21. Semana 16, piel de hembra (Glucantime). DX: dermatitis fibrosante (DF). A. Macrofotografía. Cicatriz irregular, de bordes retraídos, pálida, firme al tacto e inmóvil. B. Microfotografía. Dermis. se observa fibrosis moderada. H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis. Infiltrado leucocitario mixto leve constituido por linfocitos y escasos eosinófilos H-E 400x.

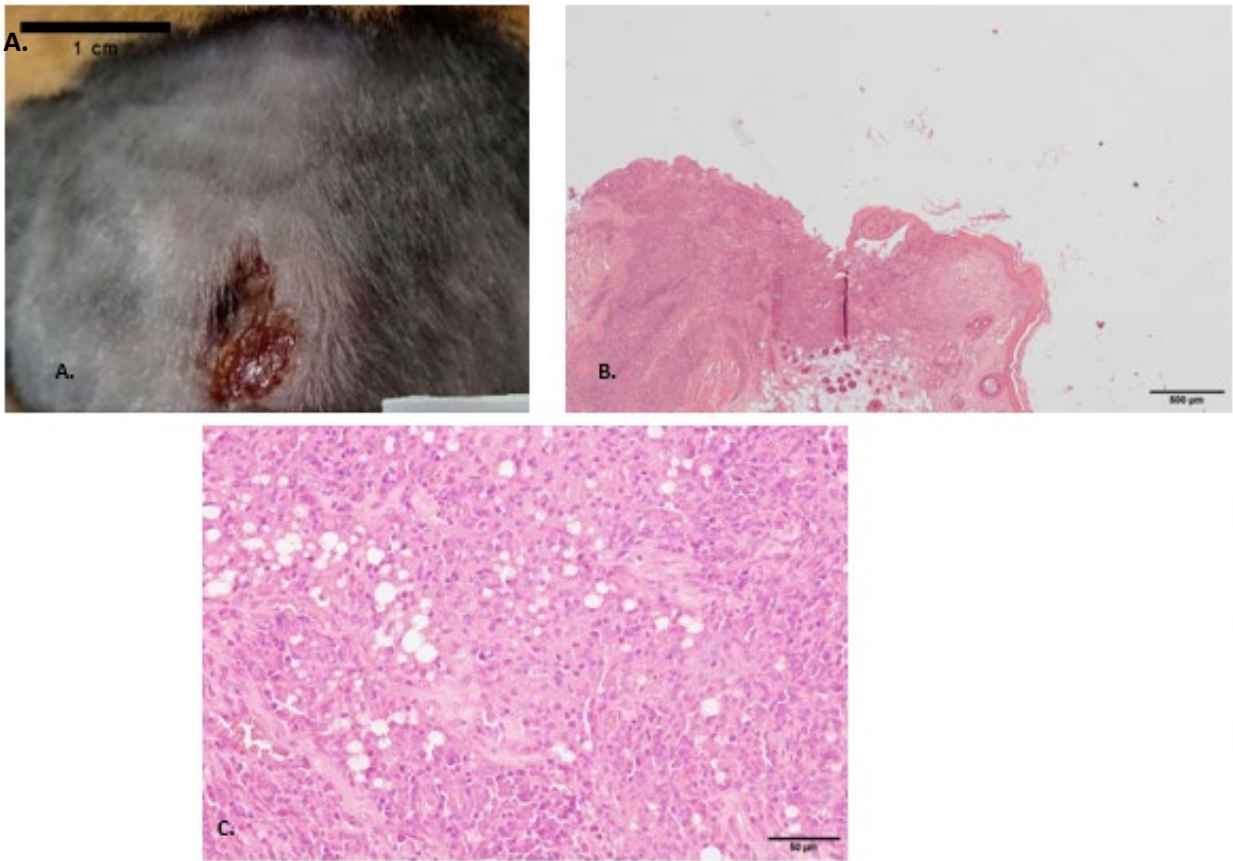


Figura 22. Semana 16, piel de macho (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. úlcera cóncava, de forma irregular, de consistencia firme e inmóvil, costrosa. B. Microfotografía. Dermis y músculo. Ulceración extensa, infiltrado leucocitario mixto severo de distribución difusa. Hiperplasia moderada de la epidermis, hiperqueratosis ortoqueratósica H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis profunda. Detalle del infiltrado, constituido principalmente por macrófagos activados con moderada cantidad de amastigotes intracitoplasmáticos, en menor proporción por células epitelioides, linfocitos, plasmocitos y neutrófilos H-E 400x.

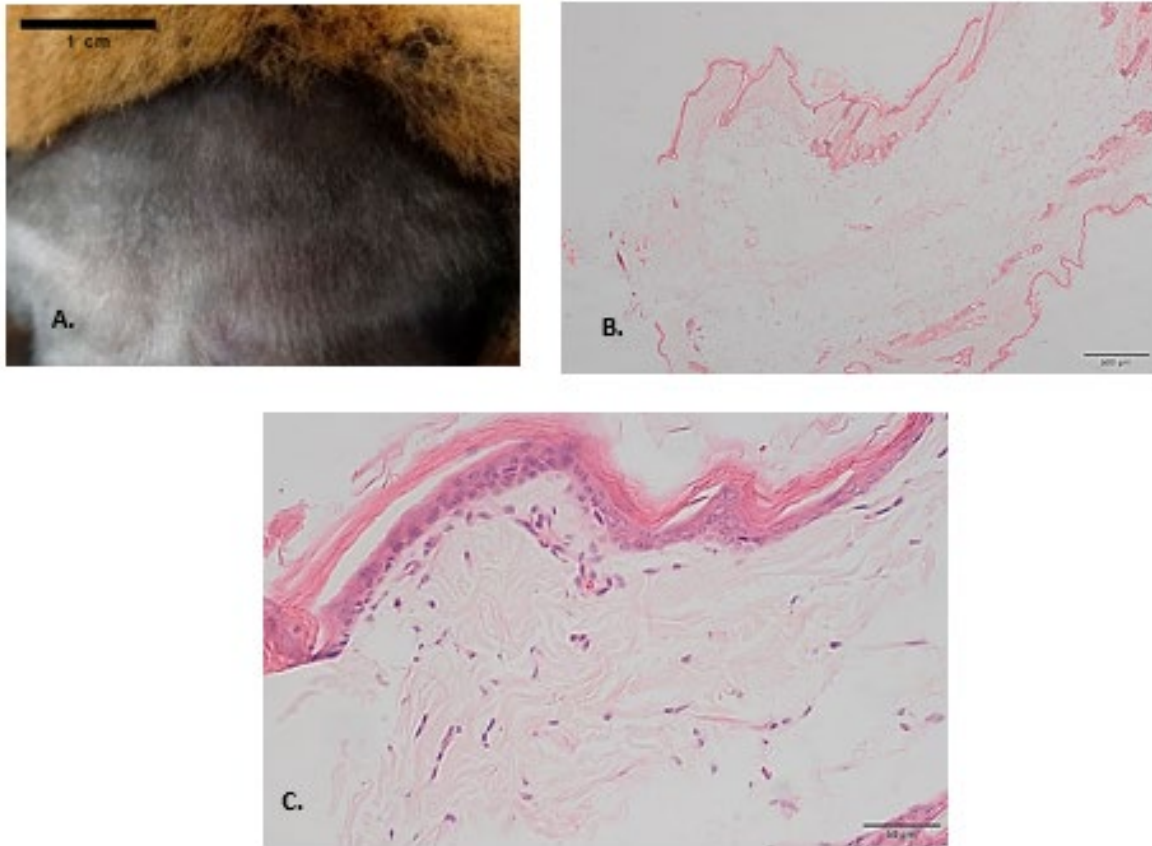


Figura 23. Semana 16, piel de macho (Glucantime). DX: dermatitis fibrosante (DF). A. Macrofotografía. Cicatriz irregular, de bordes retraídos, pálida, firme al tacto e inmóvil B. Microfotografía. Dermis. Fibrosis moderada. La superficie epidérmica se observa irregular H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis. Infiltrado leucocitario leve constituido por escasos macrófagos. Hiperqueratosis ortoqueratósica moderada en epidermis. H-E 400x.

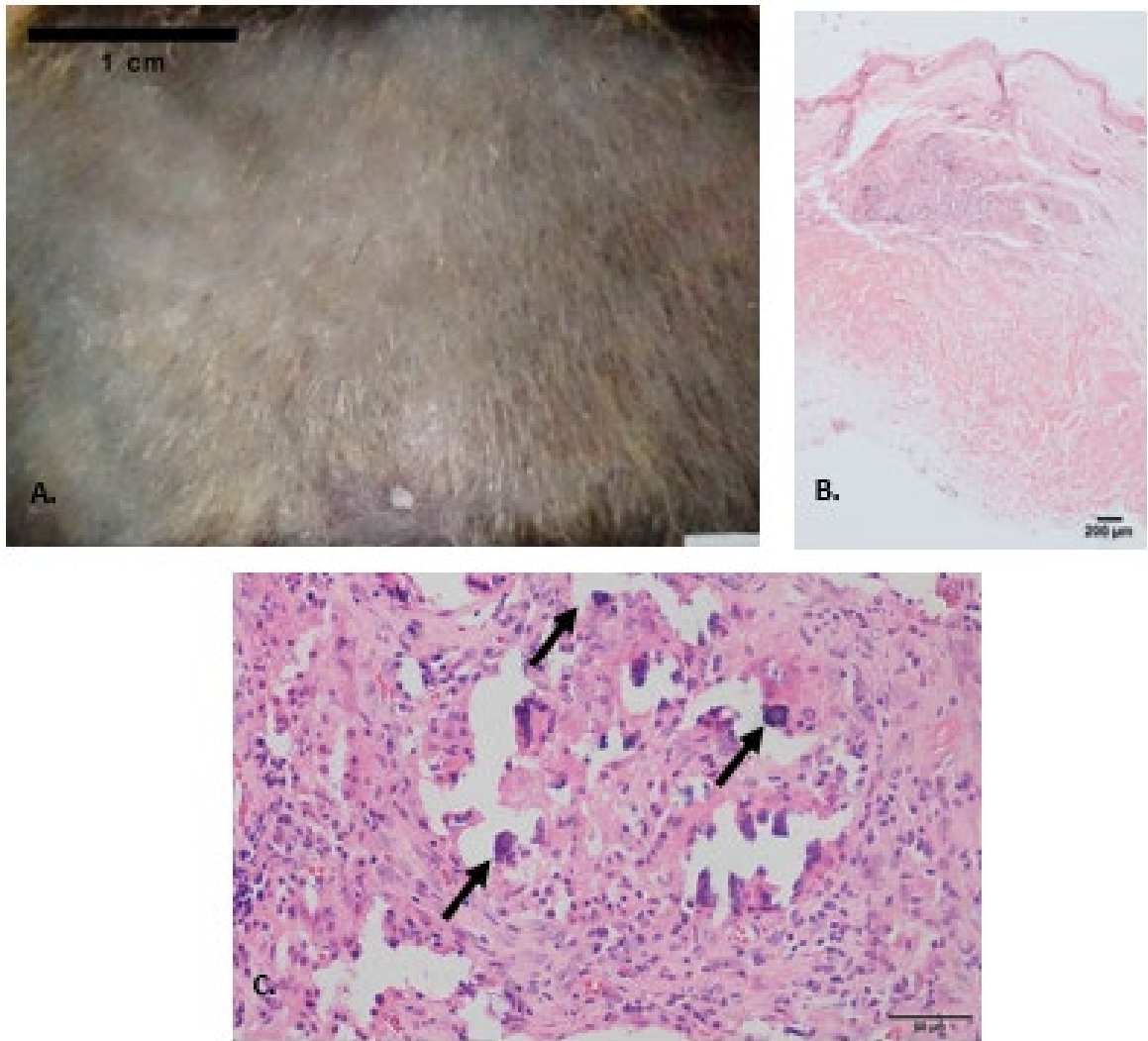


Figura 24. Semana 22, piel de hembra (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa nodular (DGN). A. Macrofotografía. Cicatriz ovoide, coloración grisácea uniforme, con aparente descamación blanquecina leve, firme al tacto e inmóvil. B. Microfotografía. Dermis. infiltrado leucocitario mixto de distribución focal H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis. Detalle del infiltrado, constituido por células epitelioides, células gigantes multinucleadas tipo *Langhans* y en menor proporción por linfocitos y escasos neutrófilos. Hay depósitos de un material basófilo laminar de distribución multifocal en cantidad leve (cuerpos de shcaumann) (las flechas señalan algunos) H-E 400x.

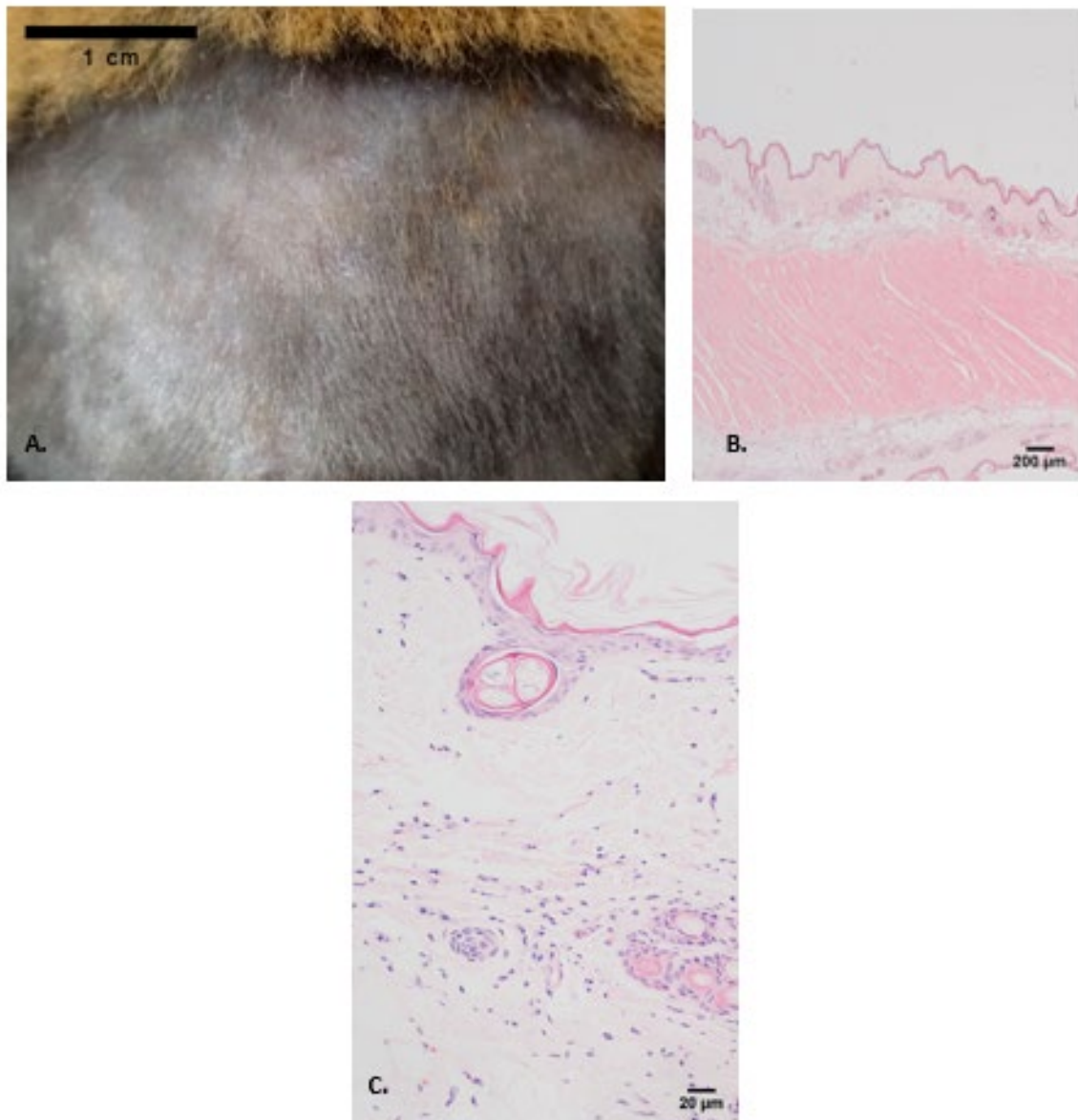


Figura 25. Semana 22, piel de hembra (Glucantime). DX: dermatitis fibrosante (DF). A. Macrofotografía. Cicatriz poco visible, de bordes levemente retraídos, coloración homogénea, pálida, firme al tacto. B. Microfotografía. Dermis. fibrosis moderada. La superficie epidérmica se observa irregular H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis. Infiltrado leucocitario leve constituido por escasos macrófagos y escasos linfocitos H-E 400x.

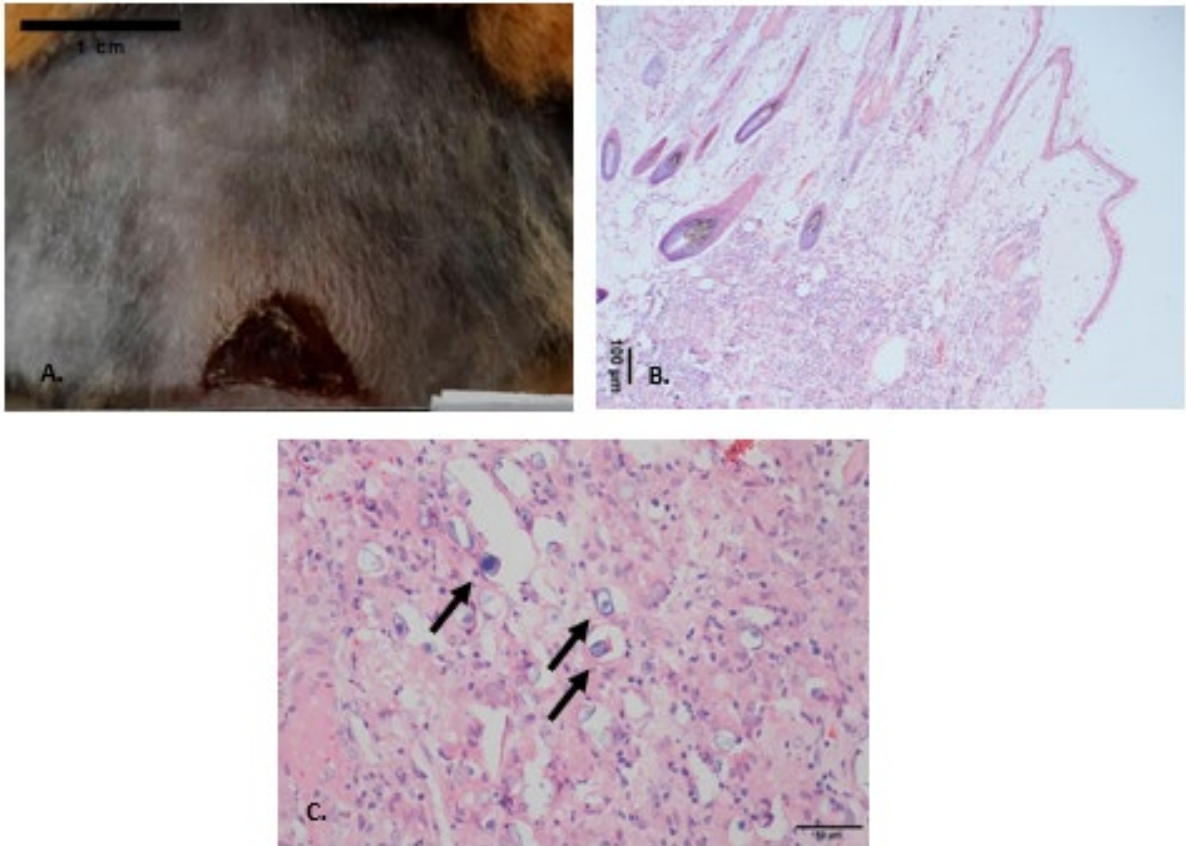


Figura 26. Semana 22, piel de macho (Alyeyuba). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DF). A. Macrofotografía. úlcera cóncava, de forma piramidal, de consistencia firme e inmóvil, costrosa, coloración rojiza oscura, superficie irregular. B. Microfotografía. Dermis. infiltrado leucocitario mixto de distribución difusa H-E 100x. C. Microfotografía. Dermis. Detalle del infiltrado, El infiltrado leucocitario está constituido por macrófagos activados, células epitelioides, células gigantes multinucleadas tipo *Langhans* y en menor proporción por linfocitos y neutrófilos. Hay depósitos de un material basófilo laminar concéntrico de distribución multifocal en cantidad moderada (cuerpos de shcaumann) H-E 400x.

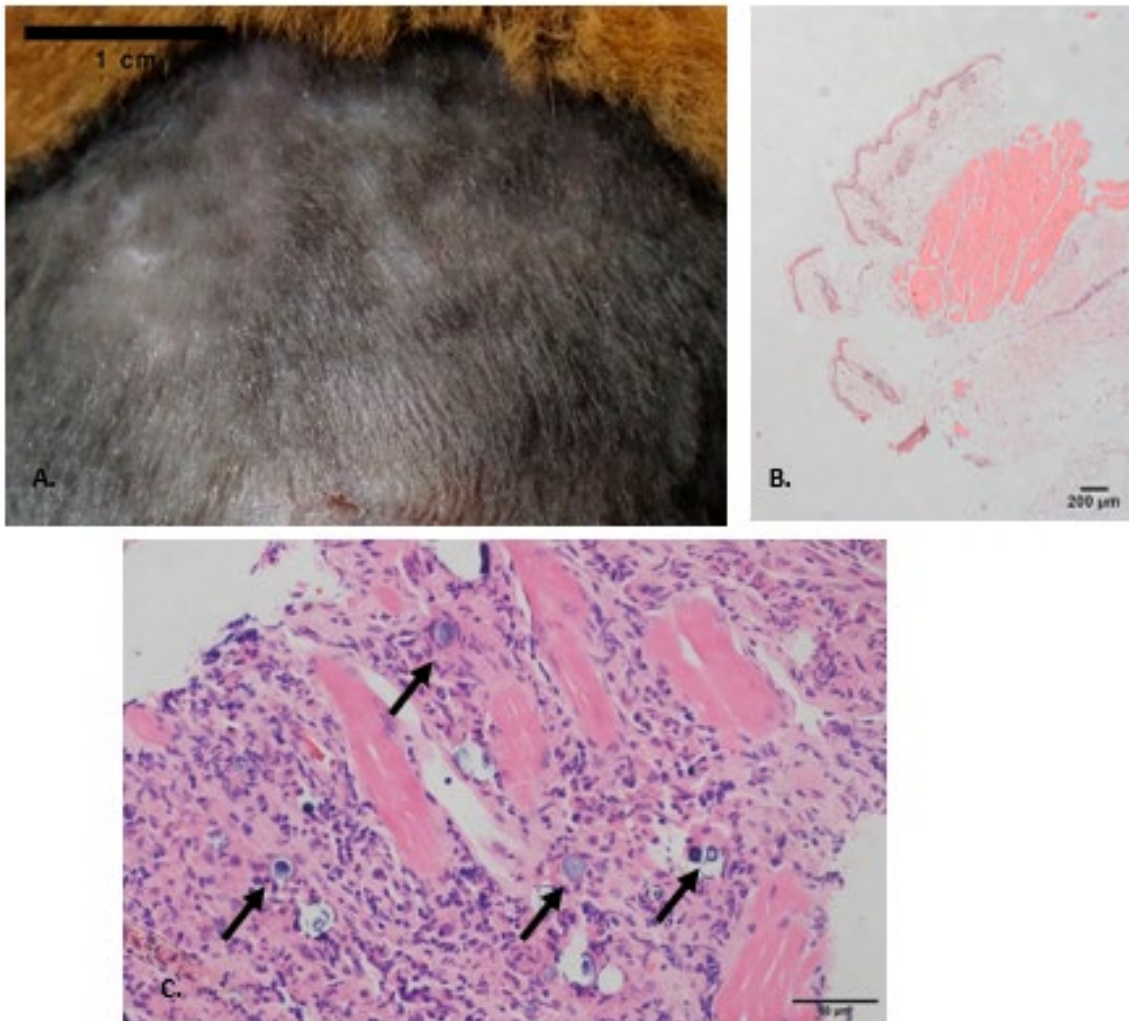


Figura 27. Semana 22, piel de macho (Glucantime). DX: dermatitis granulomatosa difusa (DGD). A. Macrofotografía. Cicatriz alargada de forma ovoide, pálida, levemente deprimida, con un área rojiza central y bordes moderadamente retraídos. **B. Microfotografía.** Dermis y músculo. fibrosis moderada y un infiltrado leucocitario multifocal moderado H-E 100x. **C. Microfotografía.** Dermis profunda y músculo. Infiltrado leucocitario mixto de distribución difusa. El infiltrado leucocitario está constituido por células epitelioides, células gigantes multinucleadas tipo *Langhans* y en menor proporción por neutrófilos. Hay depósitos de un material basófilo de distribución multifocal en cantidad moderada a severa (cuerpos de shcaumann) H-E 400x.

Tabla 9. Detección de RNA de *L. braziliensis* por RT qPCR en piel. De los 18 fragmentos de piel evaluados, solo tres de ellos presentaron carga parasitaria variable y los tres fueron de animales de la semana 22.

Individuos (absoluto)	15	1	1	1
Individuos (relativo)%	83,33	5,55	5,55	5,55
Carga (parásitos/ MI)	0	8	33	50

Tabla 10. Detección de RNA de *L. braziliensis* por RT qPCR en piel tejidos extracutáneos (bazo). De los 60 fragmentos de bazo evaluados durante todo el ensayo, en 21 de ellos se detectaron cargas parasitarias variables por PCR. Los otros 39 fragmentos resultaron negativos por esta prueba.

Individuos (absoluto)	Individuos (relativo)%	Carga (parásitos/MI)
39	65	0
1	1,67	4
1	1,67	12
1	1,67	19
1	1,67	22
2	3,33	23

1	1,67	27
1	1,67	30
1	1,67	32
1	1,67	33
1	1,67	38
1	1,67	40
1	1,67	41
1	1,67	42
1	1,67	45
1	1,67	51
1	1,67	59
1	1,67	60
1	1,67	66
1	1,67	67
1	1,67	94

Tabla 11. Detección de RNA de *L. braziliensis* por RT qPCR en piel tejidos extracutáneos (hígado). De los 60 fragmentos de hígado evaluados durante todo el ensayo, en 22 de ellos se detectaron cargas parasitarias variables por PCR. Los otros 38 fragmentos resultaron negativos por esta prueba.

Individuos (absoluto)	Individuos (relativo)%	Carga (parásitos/ MI)
38	63,33	0
1	1,67	10
1	1,67	15
1	1,67	16
1	1,67	17
1	1,67	21
1	1,67	22
1	1,67	26
2	3,33	27
2	3,33	29
1	1,67	31
2	3,33	32
1	1,67	35
1	1,67	45
1	1,67	54
1	1,67	55
1	1,67	63
1	1,67	67
1	1,67	72
1	1,67	160





11. Bibliografía.

- Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J and Boer, M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5), 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Issam, B., Thys, S., Filali, H., Brouwere, V., Sahibi, H and Boelaert, M. 2017. Psychosocial Impact of Scars Due to Cutaneous Leishmaniasis on High School Students in Errachidia Province, Morocco. *Infectious Diseases of Poverty* 6(1). doi: 10.1186/s40249-017-0267-5.
- Callohuari, R., Sandoval, M and Gutiérrez, O. 2017. Efecto Gastroprotector y Capacidad Antioxidante Del Extracto Acuoso de Las Vainas de *Caesalpinia Spinosa* 'Tara', En Animales de Experimentación. *Animales de La Facultad de Medicina*. 78(1), 61. doi: 10.15381/anales.v78i1.13023.
- Essayag, S. M., M. E. Landaeta, C. Hartung, S. Magaldi, L. Spencer, R. Suárez, F. García, and Pérez, E. 2002. Histopathologic and Histochemical Characterization of Calcified Structures in Hamsters Inoculated with *Paracoccidioides Brasiliensis*. *Mycoses*. 45(9–10), 351–57. doi: 10.1046/j.1439-0507.2002.00785.x.
- Gomes-Silva, A., Gardel, J., Peralva, R., Plácido-Pereira, R.M and Da-Cruz, A.M. 2013. Golden Hamster (*Mesocricetus Auratus*) as an Experimental Model for *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* Infection. *Parasitology*. 140(6), 771–79. doi: 10.1017/S0031182012002156.
- Handler, M., Parimal, A., Kapila, R., Al-Qubati, Y and Schwartz, R. 2015. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: Clinical Perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 73(6), 897–908.
- Isaza, D. M., Restrepo, M., Restrepo, R. Caceres-Dittmar, G and Tapia, F. 1996. Immunocytochemical and Histopathologic Characterization of Lesions from Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania Panamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 55(4), 365–69. doi: 10.4269/ajtmh.1996.55.365.
- Kennedy, J. 2016. *Pathology of Domestic Animals - 5th Edition*. Ontario.
- Laurenti, M. D., M. N. Sotto, C. E. Corbett, V. L. da Matta, and M. I. Duarte. 1990.



- Experimental Visceral Leishmaniasis: Sequential Events of Granuloma Formation at Subcutaneous Inoculation Site. *International Journal of Experimental Pathology*. 71(6), 791–797.
- Magalhães, A. V., M. A. Moraes, A. N. Raick, A. Llanos-Cuentas, J. M. Costa, C. C. Cuba, and P. D. Marsden. 1986. Histopathology of Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania Braziliensis Braziliensis*. 1. Histopathological Patterns and Study of the Course of the Lesions. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 28(4), 253–262. doi: 10.1590/s0036-46651986000400008.
- Mcgwire, B. S., and A. R. Satoskar. 2014. Leishmaniasis: Clinical Syndromes and Treatment. *QJM*. 107(1), 7–14. doi: 10.1093/qjmed/hct116.
- Montenegro-Idrogo, J., Montañez-Valverde, R., Chian, C and Benites-Villafane, C. 2014. Leishmaniasis Mucocutánea En Un Paciente Con Infección Por VIH.” *Revista Chilena de Infectología*. 31(5):610–14. doi: 10.4067/S0716-10182014000500015.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J and Papadopoulou, B. 2004. Leishmaniasis: Drugs in the Clinic, Resistance and New Developments. *Drug Resistance Updates*. 7(4–5), 257–66. doi: 10.1016/j.drug.2004.07.002.
- Ramirez, J. R., S. Agudelo, C. Muskus, J. F. Alzate, C. Berberich, D. Barker, and Velez, I.D. 2000. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: The Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(10), 3768–73. doi: 10.1128/jcm.38.10.3768-3773.2000.
- Rey, J. A., B. L. Travi, A. Z. Valencia, and N. G. Saravia. 1990. Infectivity of the Subspecies of the *Leishmania Braziliensis* Complex in Vivo and in Vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 43(6), 623–31. doi: 10.4269/ajtmh.1990.43.623.
- Ribeiro-Romão, Raquel., Peralva, A., Saavedra, F., Da-Cruz, A., Fonseca, A and Moreira, O. 2016. Development of Real-Time PCR Assays for Evaluation of Immune Response and Parasite Load in Golden Hamster (*Mesocricetus Auratus*) Infected by *Leishmania (Viannia) Braziliensis*. *Parasites and Vectors* 9(1). doi: 10.1186/s13071-016-1647-6.
- Ríos, J., Saladaña, A., Calzada, J., Arias, J., Díaz, R., González, K. 2012. Comparación Entre Histopatología y PCR, Para Diagnóstico de Leismaniasis Tegumentaria.



Dermatología, Cosmética, Médica y Quirúrgica. 10(1), 13–20.

- Robledo, Sara M., Lina M. Carrillo, Alejandro Daza, Adriana M. Restrepo, Diana L. Muñoz, Jairo Tobón, Javier D. Murillo, Anderson López, Carolina Ríos, Carol V. Mesa, Yulieth A. Upegui, Alejandro Valencia-Tobón, Karina Mondragón-Shem, Berardo Rodríguez, and Iván D. Vélez. 2012. “Cutaneous Leishmaniasis in the Dorsal Skin of Hamsters: A Useful Model for the Screening of Antileishmanial Drugs.” *Journal of Visualized Experiments* (62). doi: 10.3791/3533.
- Robledo, SM, YA Barrera, M. Arboleda, J. Quintero, AM Restrepo, and ID Vélez. 2017. “Preclinical Studies of Antileishmanial Activity of Caesalpinia Spinose and Potential Utility in the Treatment of Patients with Cutaneous Leishmaniasis.” P. Tu-PO-36 in *65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA 2017)*. Vol. 4. Georg Thieme Verlag KG.
- Saldanha, M.G., Queiroz, A., Roberto, P., Machado, L., De Carvalho, P., De Carvalho, E and Arruda, S. 2017. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 96(3), 645–52. doi: 10.4269/ajtmh.16-0539.
- Saunders, B. M., Frank, A.A and Orme I.O. 1999. Granuloma Formation Is Required to Contain Bacillus Growth and Delay Mortality in Mice Chronically Infected with Mycobacterium Tuberculosis. *Immunology.* 98(3), 324–28. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00877. x.
- Sereno, D., P. Holzmuller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouaiissi, and J. L. Lemesre. 2001. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania Infantum Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(7), 2064–2069. doi: 10.1128/AAC.45.7.2064-2069.2001.
- Silva, F., França, M., Sá Santos, E.M. Torres, S.M., Miyuki, E. Nascimento, R.A. and Alves, L. 2016. Carga Parasitária Em Fragmentos de Pele Intacta e Ulcerada Em Cães Com Leishmaniose. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 25(1), 127–30. doi: 10.1590/S1984-29612016014.
- Suárez, M., Valencia, B., Jara, M., Boggild, A., Dujardin, J., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J and Adai, V. 2015. Quantification of Leishmania (Viannia) Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-Site and Intersampling Variability



in Parasite Load. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(7), 1–14. doi: 10.1371/journal.pntd.0003936.

Travi, B., Osorio, P.C. Bysani, M., Arteaga, L and Saravia, N. 2002. Gender Is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with *Leishmania* Spp. *Infection and Immunity*. 70(5), 2288–96. doi: 10.1128/IAI.70.5.2288-2296.2002.