

INTERACCION DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA DONOVANI CON CELULAS DE EXUDADO PERITONIAL DE RATONES MEDIANTE LA INFLUENCIA DE LA QUIMOTRIPSINA

Lucila ARCAY (1) & Elizabeth BRUZUAL (2)

RESUMEN

Se hace un estudio de la interacción de promastigotes de *Leishmania donovani* con células de exudado peritoneal de ratón (c e p) mediante la influencia de la quimotripsina. La adhesión de los promastigotes a las c e p fue terminal y marginal, y en observaciones hechas a partir de los 10 minutos de enfrentamiento, esta adhesión fue nula hasta los 30 minutos en el grupo tratado, y sólo a las das horas hubo un pequeño incremento (2.4%) con respecto al control. Se observa marcada disminución en todos los parámetro medidos, tales como enlace, penetración, multiplicación intracelular, división de formas flageladas, en el grupo tratado. La quimotripsina favorece la formación de formas intermedias flageladas, heciendose el parásito piriforme y esférico, apareciendo una forma aberrante de extremo anterior cilíndrico que semeja a una forma coanoflagelada. Se sospecha que la enzima reduce efectivamente fragmentos proteicos o péptidos, los cuales pueden haber sido tan pequeños como para esconder a otros ligandos relacionados con la adhesión macrófago-parásito.

UNITERMOS: Calazar — *Leishmania donovani* — Peritonio — Ratos.

INTRODUCCIÓN

Siendo los organismos de *Leishmania spp.*, parásitos intracelulares obligados de la serie mononuclear del sistema fagocítico-mononuclear (sistema retículo-endotelial, SRE) en el mamífero hospedador, su capacidad para penetrar a las células hospedadoras constituye un paso crítico en la patogénesis de la leishmaniasis.

Leishmania donovani es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral. El parásito existe bajo dos formas esenciales, el promastigote o forma flagelada que penetra al hospedador vertebrado a través de la picada del vector Phlebotominae infectado, y el amastigote o forma esferoidal intracelular, que procede de la diferenciación del promastigote cuando éste parasita las células del sistema linfo-macrófago, eva-

diendo la acción lisosomal de la célula hospedadora y multiplicándose intracelularmente perdiendo el flagelo. La invasión y multiplicación es primaria y esencialmente dentro de macrófagos de los órganos hematopoyéticos, y en el caso de *L. donovani* se produce en forma natural, diseminación en varias visceras.

Cuando las leishmanias son introducidas en el hospedador vertebrado, tanto los macrófagos como los linfocitos se acumulan en el sitio de entrada de los promastigotes (ZUCKERMAN³⁵), por lo cual estos parásitos interactúan con unos y otros. En la interacción se producen una serie de eventos por medio de los cuales los parásitos terminan alojándose dentro de las células hospedadoras, evadiendo los mecanismos y efec-

(1) Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
(2) Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central Caracas, Venezuela

tos destructivos de la maquinaria lisosomal, multiplicándose y mostrando fusión con el fagolisosoma (ALEXANDER & VICKERMAN²; LEWIS & PETERS²⁴; CHANG & DWYER¹³), conociéndose también que la rata pinocítica aumenta en macrófagos infectados con leishmania y que las vacuolas parasitóforas presentan propiedades de lisosomas secundarios (CHANG¹²).

Utilizando la quimotripsina como agente inespecífico en la infección experimental de ratones y hamsters con *L. mexicana amazonensis* (BRUZUAL & ARCAÿ⁶) hemos encontrado lesiones extensas y una anatomopatología con fisionomías distintas a las descritas anteriormente en relación al tactismo en leishmanias productoras de leishmaniasis cutáneas que conducen a la visceralización de una *Leishmania* sp. dermatropa (GUIMARÃES^{16,17,18,19}; MEDINA & ROMERO²⁵; COUTINHO & COELHO¹⁰; SCHNUR²⁸; ARCAÿ et al.,⁴; OCHOA & ARCAÿ²⁶; ARCAÿ³).

El hecho de que amastigotes procedentes de una leishmaniasis experimental cutánea, se diseminan en las vísceras de los animales tratados con quimotripsina, nos indujo a estudiar la interacción de promastigotes con células de exudado peritoneal de ratones (c e p) mediante la acción de la quimotripsina.

Es esencial en la patogénesis de leishmaniasis la capacidad de las especies de *Leishmania* de adherirse a la superficie de los fagocitos mononucleares, antes de penetrar a estas células hospedadoras. Los promastigotes pueden eludir su confrontación inicial con fagocitos mononucleares, residiendo temporalmente en otros tipos de células, para transformarse en amastigotes bajo condiciones naturales.

Utilizando un sistema de cultivo *in vitro* de monocapas celulares de exudado peritoneal de ratón, hemos estudiado la fase de adhesión y de multiplicación de promastigotes de *L. donovani* procedentes de un cultivo *in vitro* de una cepa mantenida en Medio Davis, mediante la influencia de la quimotripsina, cuantificando el porcentaje de adhesión de promastigotes libres y de formas flageladas intermedias, multiplicación dentro de las células invadidas, así como cambios morfológicos presentados en los parásitos de los grupos tratados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las células de exudado peritoneal de ratón fueron extraídas de acuerdo a la técnica modificada de SUTTER³⁰. Ratones blancos de la cepa NMRI se inyectaron diariamente durante 8 días por vía intraperitoneal (ip) con 50 mg/kg de peso con ácido ascórbico en un volumen de 0.5 ml de agua destilada; al cuarto día se comenzó a inyectar también 3 ml de solución GKN (solución de cloruro sódico, cloruro de potasio y glucosa) para provocar el proceso inflamatorio. Al cabo de este tiempo se procedió a obtener las c e p para lo cual se anesteciaron los ratones con éter, se les afeitó la región ventral, tórax y abdomen, desinfectándola con alcohol y solución de yodo al 2%.

Se le inyecta a cada ratón 8 a 10 ml de GKN via ip. Se masajea suavemente y se hace una pequeña incisión lateral y longitudinal en la parte inferior del abdomen, para extraer el exudado peritoneal con una jeringa de 10 ml, aguja n.º 18. Se deshecha el líquido cuando tiene aspecto sanguinolento. Se va colocando el exudado en tubos de centrifuga para ser sometido a 800 rpm durante 10 minutos. Se deshecha el sobrenadante y se lavan las células con GKN fría mediante centrifugación; se repite el lavado y se resuspenden las células en 2 ml de Medio Mc Coy's más 10% de suero fetal de ternera (SFT). El pH se ajustó a 7.2. Se hace la cuenta celular mediante hemocitómetro y se prepara una suspensión a una concentración de 5×10^5 células/ml. Se siembran los tubos Leighton con laminilla conteniendo 2 ml de Medio Mc Coy's adicionado con SFT más 0.2 mg de Gentamicina. Se colocan en estufa a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se incuban durante 12 horas y se cambia el medio antes de sembrar los parásitos.

Promastigotes de *L. donovani* mantenidos por pases sucesivos en Medio Davis, fueron lavados dos veces en sol. GKN fría a 2.500 g/4°C/10 minutos. Se resuspendieron en Medio Mc Coy's adicionado de L. Glutamina, bicarbonato de sodio, Gentamicina y 10% SFT. Se contaron los parásitos en cámara hemocitométrica y se utilizaron dos promastigotes/célula (1×10^6 promastigotes) en cada tubo Leighton. La esterilización de los medios se realizó a través de membranas Millipore de 0.22 μ .

Se establecieron dos grupos en cada experimento: un grupo control sin tratamiento y un grupo experimental tratado con Quimotripsina (Armour) 0.2 ml/tubo en dilución 1:1000, la cual fue administrada en seguida de haber sembrado los parásitos.

De cada grupo se extrajeron dos laminillas en los siguientes intervalos: 10, 20, 30, 45 minutos y 1, 2, 3, 6, 12 y 18 horas. Se fijaron en metanol y se tiñeron por la técnica May Gröndwald-Giemsa.

Cada una de las laminillas teñidas fue observada bajo lente de inmersión (1200 X) y se midieron los siguientes parámetros mediante contadora manual de teclas en 20 campos escogidos al azar: número de células de exudado peritoneal, número de promastigotes libres, número de promastigotes y células flageladas intermedias adheridos a las c e p, número de parásitos libres en proceso de división, número de formas esféricas, número de nidos de amastigotes (número de c e p parasitadas).

RESULTADOS

Al estudiar la interacción de promastigotes de *Leishmania donovani* con c e p de ratones mediante la influencia de la quimotripsina, aplicando la técnica modificada de SUTTER³⁰, hemos medido diferentes parámetros: porcentaje de c e p parasitadas (número de nidos de amastigotes por célula invadida); adherencia de promastigotes y formas flageladas intermedias; porcentaje de formas libres en división; acción de la quimotripsina sobre el número de c e p; modificaciones morfológicas del parásito; tipos de células hospedadoras.

El porcentaje de c e p infectadas equivale al número de nidos de amastigotes contenidos dentro de ellas. En el Gráfico 1 podemos observar que en el grupo control este porcentaje se mantuvo en cero en los primeros 10 minutos, mientras que para el grupo tratado fue nulo hasta los 45 minutos, para elevarse ligeramente al 2.8% a la hora, descender a 2.4% a las dos horas, para luego caer lentamente a las tres horas hasta cero, manteniéndose así hasta las 18 horas de observación. En los controles se inicia la multiplicación intracelular a los 20 minutos (1.6%), a los cuarenta y cinco minutos se eleva a 16.8% manteniéndose una curva

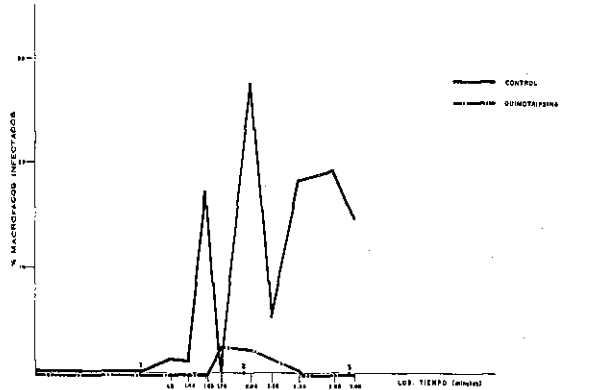


Gráfico 1

de crecimiento oscilatorio que se incrementa y decrece a la hora, para alcanzar un máximo de 27.4% a las dos horas, manteniéndose a las 18 horas en un 15% de amastigotes en división.

Calculamos y medimos el porcentaje de formas libres adheridas con respecto al número de c e p (las cuales referimos en nuestros gráficos como macrófagos), observándose que la adhesión de los promastigotes se presenta elevada a los diez minutos de observación en el grupo control (12%) mientras que este valor es casi nulo en el grupo tratado hasta los 30 minutos, en donde se manifiesta ligeramente (1.8%), descendiendo a cero y se mantiene así casi todo el tiempo, con excepción de a las dos horas en que tiene una pequeña elevación (2.4%) por encima del control (Gráfico 2).

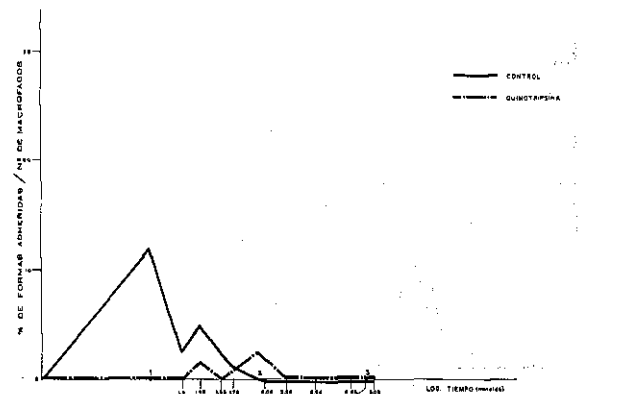


Gráfico 2

Los valores del porcentaje de promastigotes en división con respecto al porcentaje de formas libres flageladas fueron nulos para el gru-

po tratado hasta los 45 minutos, para incrementarse al 8,8% a la hora, descender un poco a las dos horas (7,5%) y caer bruscamente a cero hasta las 18 horas. Este parámetro en los controles demuestra un incremento elevado a los veinte minutos (11,3%) presentando una curva de crecimiento oscilante parecida al parámetro del control del % de macrófagos parasitados (Gráfico 3).

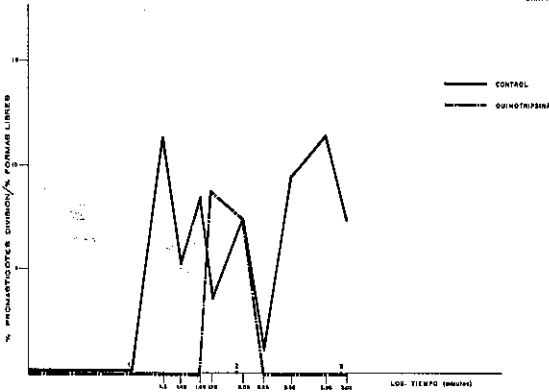


Gráfico 3

Formas flageladas intermedias piriformes y esféricas en relación al porcentaje de promastigotes alargados, presentan curvas de crecimiento que oscilan en forma parecida a las anteriores, llegando hasta el 100% en el grupo tratado y en diferentes intervalos, pareciendo que la quimotripsina favorece la diferenciación de promastigotes alargados a formas flageladas in-

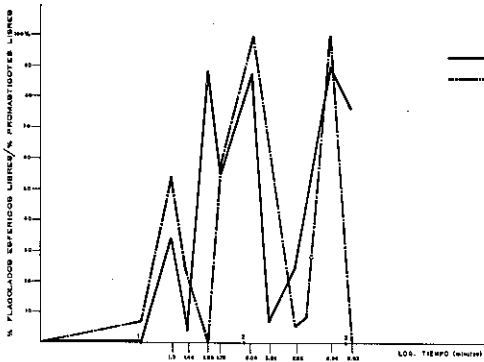


Gráfico 4

termedias que llegan a ser esféricas (Gráfico 4).

Con respecto al efecto de la quimotripsina sobre el número de c e p, esta cuenta aparece favorecida por la quimotripsina, con excepción de los primeros diez minutos y los últimos intervalos en que decae a partir de las tres horas para desaparecer la monocapa a las 18 horas, mientras que en el grupo control comienza a ascender de nuevo a partir de las dos horas (Gráfico 5).

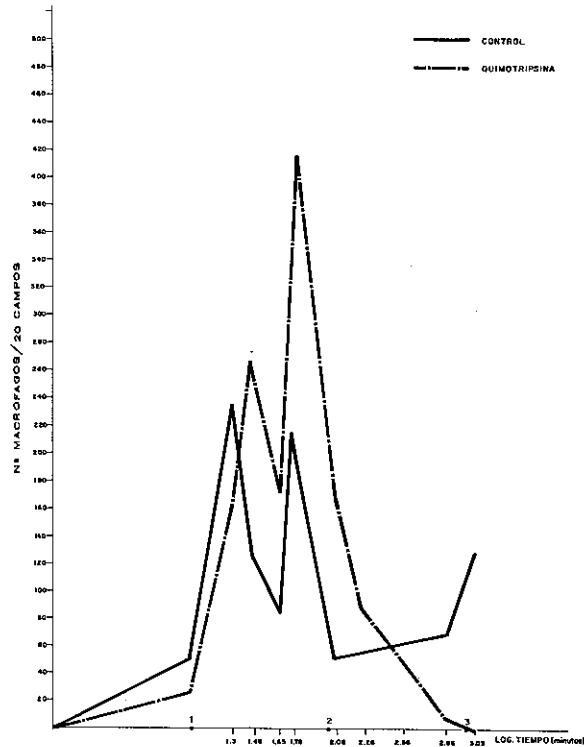


Gráfico 5

Aplicando la fórmula usada por WYLER y SUZUKI³³ para determinar el porcentaje de probabilidad de adhesión, podemos decir que dicho valor alcanza valores del 100% en varios intervalos (Gráfico 6). Por encima del 100% hay una facilitación, y por debajo, hay inhibición de la adhesión.

$$\% \text{ Probabilidad Adhesión} = \frac{\% \text{ Adhesión (Control)} - \% \text{ Adhesión (Quim.)}}{\% \text{ Adhesión (Control)}} \times 100$$

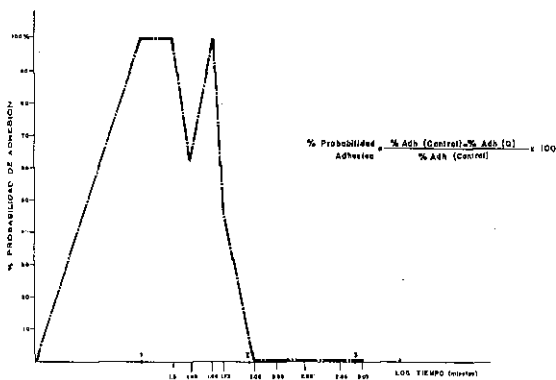


Gráfico 6

Morfogénesis:

Morfológicamente las formas libres flageladas son alteradas por la acción de quimotripsina, prevaleciendo las formas flageladas esféricas, con modificaciones en cuanto a la división del kinetoplasto y del núcleo.

En la morfogénesis de los promastigotes de *L. donovani* mediante la influencia de la quimotripsina, se presenta una forma flagelada con una prolongación cilíndrica anterior que le da un aspecto de balón o forma coanoflagelada.

A pesar de que en los gráficos nos referimos a las c e p como macrófagos, no son éstas las células más abundantes en esta monocapa, ya que abundan los linfocitos, en los cuales podemos observar adhesión y atrapamiento por la porción terminal del parásito. También es frecuente la presencia de amastigotes dentro de monocitos, siendo éstas las células por las cuales muestran más afinidad los parásitos leishmánicos. Así mismo, también pudimos observar amastigotes dentro de polimorfonucleares dentro de macrófagos.

DISCUSIÓN

En general, cuando las leishmanias productoras de leishmaniasis cutáneas son introducidas en hamsters y ratones, se produce una barrera formada por los macrófagos peritoneales que impide su llegada y establecimiento en las vísceras, por eso cuando la inoculación es intracardiaca, los parásitos se localizan en el bazo durante meses (STAUBER²⁹; OCHOA & ARCAY²⁶), y por vía endovenosa las leishmanias en ratón se hacen presentes intracelularmente

en hígado, bazo y médula ósea (WONDE & LAMY³²).

Con el uso de la quimotripsina, como agente anti-inflamatorio y capaz de modificar las condiciones del hospedador, hemos observado visceralización en hamsters y ratones inoculados con *L. mexicana amazonensis*, lo cual nos hace suponer que los macrófagos peritoneales no han podido impedir el paso y multiplicación de los parásitos en macrófagos viscerales, lo cual nos ha inducido a estudiar la interacción *in vitro* de células de exudado peritoneal de ratón con promastigotes de *Leishmania* mediante la influencia de la quimotripsina.

En el proceso de la interacción leishmania-célula hospedadora hay que tomar en cuenta una serie de eventos: enlazamiento y/o adhesión, penetración a la célula hospedadora para alcanzar el fagosoma, fusión del fagosoma con el fagolisosoma, multiplicación del parásito.

La pérdida de la infectividad de los promastigotes para mamíferos podría reflejar la falla de uno de los procesos o de varios de ellos, tales como adherencia de los promastigotes a los macrófagos; endocitosis de los parásitos; subsecuente transformación de promastigotes a amastigotes; supervivencia de los parásitos dentro de los fagolisosomas; replicación, liberación o infección de otros macrófagos (GIANNINI et al.¹⁴).

Gran número de investigadores consideran que los promastigotes se aproximan a los macrófagos por el flagelo primero en la mayoría de los casos, siguiendo luego otras formas de adhesión como la marginal y la terminal, pudiendo ser por cualquier parte del promastigote (ZENIAN & col.³⁴). En nuestros experimentos observamos tanto la adhesión terminal como la marginal.

Existe evidencia de que la atracción no es ejercida sobre el promastigote, pero el macrófago busca al parásito, así como el promastigote activa al complemento con la producción de una sustancia reguladora del complemento (C_{5a}), la cual es quimiotáctica para los macrófagos (BRAY⁸). También existe la posibilidad de que el complemento pueda atrapar al promastigote y actúa como un puente de atracción para el receptor del complemento sobre la superficie del macrófago (BIANCO & col.⁷; HERMAN²⁰).

La superficie de las membranas de promastigotes infectivos y no infectivos tiene diferentes patrones de aglutinación de lectinas (HERNÁNDEZ & col.²¹), lo cual sugiere la presencia de receptores de superficie. Ya que las leishmanias y macrófagos interactúan unos con otros en sus respectivas superficies durante la adhesión, GIANNINI & col.¹⁴ consideran como hipótesis que los promastigotes infectivos pueden perder sus receptores para las membranas de los macrófagos y fallar en la adhesión.

Observando los resultados obtenidos para los otros parámetros medidos (promastigotes libres, número de formas esféricas, número de nidos de amastigotes o porcentaje de macrófagos infectados), los gráficos revelan que los valores del grupo tratado con quimotripsina son siempre inferiores a los del grupo control (sin tratamiento).

La interacción de promastigotes y células de exudado peritoneal de ratón refleja su conducta *in vivo*. La quimotripsina debe actuar sobre los ligandos de superficie de las células del sistema de interacción, impidiendo no sólo la adhesión y enlazamiento, sino la replicación dentro de las células del exudado peritoneal.

La noción de sistemas ligado-receptores para la interacción de membranas plásmicas de microorganismos con células hospedadoras (KEUSCH²²) ha emergido de módulos conceptuales de la interacción de moléculas solubles tales como hormonas, péptidos y moléculas aceptoras sobre las superficies de las células de los mamíferos (CUATRECASAS & HOLLEMBERG¹¹). Sin embargo, la adhesión de entidades particulares tales como amastigotes y monocitos, con interacciones altamente complejas posiblemente envuelva una serie de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (KEUSCH²³).

Nuestros resultados *in vivo* en ratones y hamsters infectados experimentalmente con *Leishmania mexicana*, especie dermatropa, y a los cuales hemos tratado con quimotripsina, nos producen resultados que van más allá de la visceralización en órganos hematopoyéticos, lo cual podríamos correlacionar con nuestras experiencias de interacción *in vitro* en monocapas celular de exudado peritoneal, en el sentido, que si la quimotripsina actúa específicamente sobre los macrófagos peritoneales de

esos animales experimentales, despejando esta barrera de macrófagos se permitiría la diseminación del parásito en hígado, bazo, genitales de los machos, riñón y corazón, como revelan nuestros resultados (BRUZUAL & ARCAY⁶).

Es importante resaltar que el grado de resistencia de los hospedadores experimentales manifestada *in vivo* no se correlaciona con el comportamiento *in vitro* de células de exudado peritoneal de un mismo hospedador resistente. Se ha demostrado la adherencia de promastigotes de *L. enrietti* (parásito que es específico del cobayo y que no es infectivo a otros mamíferos) a macrófagos de ratón, en el mismo grado o con mayor profusión que los promastigotes de *L. tropica*, parásito éste al cual el ratón es susceptible. ABAKAROVA & AKINSHINA¹ consideran que la penetración y la fagocitosis son más activas con macrófagos aislados de animales más susceptibles. En trabajos previos en nuestros laboratorios (BASTARDO & col.⁵) hemos demostrado el fenómeno de multiplicación y supervivencia de cepas avirulentas de *L. donovani* y *L. brasiliensis* (mantenidas *in vitro* por muchos años) en células de exudado peritoneal de rata, roedor que es resistente a las especies de *Leishmania*.

En la patogénesis de leishmaniasis es importante conocer la capacidad de *Leishmania spp.* de adherirse a las superficies de fagocitos antes de entrar a estas células hospedadoras que ellos parasitan. WYLER & SUZUKI³³ han investigado la fase de adhesión o enlace *in vitro* cuantificando el porcentaje de monocitos de sangre humana periférica penetrada usando Citocalacina para prevenir la entrada del parásito. Estos autores determinan que el pretratamiento de parásitos con tripsina, quimotripsina, pronasa y neuraminidasa redujo el enlazamiento, especialmente cuando trataban con quimotripsina y pronasa.

Ha sido propuesto que cuando los parásitos son altamente selectivos con respecto a los tipos celulares que ellos invaden, la infección podría depender del reconocimiento de sistemas específicos entre la célula hospedadora y el parásito.

Uno de los conceptos que ha ganado amplia expresión e interés es el que los receptores específicos y ligandos son expresados sobre las

superficies de la célula hospedadora y el parásito, siendo esencial la interacción de esas moléculas para la infección (SILVERSTEIN²⁷; KEUSCH²²). Además se reconoce que en la membrana plásmica de macrófagos existen receptores específicos y no específicos para una gran variedad de moléculas inmunes y no inmunes (WERB³¹).

El proceso de penetración involucra interacción directa sobre dos superficies. En nuestros resultados se observa una disminución brusca del número de promastigotes viables, lo que sugiere el reconocimiento para nuestro sistema de interacción macrófago-parásito. Suponemos que este reconocimiento se deba a la existencia de receptores apropiados en la superficie de los macrófagos y/o ligandos específicos en el flagelo, que enlazan a estos receptores.

Nuestros resultados concuerdan con los de WYLER & SUZUKI³³, en lo que se refiere a la actividad de las enzimas, por lo que consideramos responsable a la quimotripsina de los efectos observados.

Las observaciones y resultados obtenidos sugieren que la adhesión depende de la existencia de los determinantes de proteínas o glucoproteínas presentes. De acuerdo a lo estudios ultraestructurales de WYLER & SUZUKI³³ no pareciera que esos determinantes estuviesen en la membrana vacuolar derivada del hospedador que se encuentra rodeando al parásito intracelularmente, ya que las microfotografías de los autores revelan que los amastigotes no están rodeados aparentemente por la membrana. Se sospecha que la enzima reduce efectivamente fragmentos proteicos o péptidos, los cuales pueden haber sido tan pequeños como para esconder a otros ligandos relacionados con la adhesión macrófago-parásito. Como resultado de las modificaciones enzimáticas de las superficies celulares que decrecen las tasas de adhesión, podría producirse remoción de ligandos específicos relacionados en el proceso de adhesión, o podrían alterar la superficie celular en una forma no específica.

BRAY⁹, estudiando la interacción de promastigotes de *L. m. mexicana* con macrófagos *in vitro* estudia el fenómeno de adhesión utilizando una serie de enzimas proteolíticas, entre las cuales está la quimotripsina utilizada en

dos concentraciones diferentes (5000 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$ a diferentes temperaturas, 4°C y 36°C) encontrando que esta enzima afecta profundamente los resultados. Disminuye la adhesión cuando se aplica a los macrófagos en la menor concentración; pero cuando la aplicó al promastigote no obtuvo efecto. En nuestro caso, tratamos con quimotripsina después de haber enfrentado el parásito en forma de promastigote a las células hospedadoras, obteniendo una marcada disminución en todos nuestros parámetros medidos (adhesión, enlace, multiplicación intracelular, división de formas flageladas).

La quimotripsina utilizada como agente inespecífico, actúa al menos como adyuvante. Los mecanismos de los efectos adyuvantes no han sido elucidados completamente. Ciertos factores tales como la retención de un antígeno incrementado, aumento de la actividad del sistema fagocítico mononuclear (SRE), proliferación linfoides, y la creación de focos inflamatorios, se piensa estén involucrados en la actividad adyuvante.

La complejidad del material celular por sí mismo, introduce dentro de tales estudios, una complejidad de sustancias bioquímicas, que pueden tener un efecto en los procesos de sensibilización.

SUMMARY

"Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal exudate cells under the influence of the Chymotripsine."

The interaction of promastigotes of *Leishmania donovani* with mouse peritoneal exudate cells (cep) under the influence of Chymotripsine was studied. The promastigote adhered to the cep terminally and marginally. At 10-30 minutes postchallenge, adhesion was absent in the treated group, and only after two hours was there any adhesion (24% in comparison with the controls). The experimental group was markedly deficient in all the parameters of activity measured: attachment, penetration, intracellular multiplication and division of flagellates forms in comparison to controls. The Chymotripsine favored the development of intermediate flagellates forms, these being spheroid or pyriform, with example of an aberrant

form having the anterior end cylindrical similar to a choanoflagellate. It is suspected that the Chymotripsine effectively reduces protein or peptide fragments; these may have been so small as to conceal other ligands associated with macrophage-parasite adhesion.

AGRADECIMIENTO

Al histotecnólogo del Instituto de Zoología Tropical de la Universidad Central de Venezuela (UCV) por su asistencia técnica y dibujo lineal de los gráficos. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV por la subvención del Proyecto.

REFERENCIAS

1. ABAKAROVA, E. G. & AKINSHINA, G. T. — Interaction between macrophages of various origin and *Toxoplasma gondii* under conditions "in vitro". *Folia Parasit.*, 22: 195-200, 1975.
2. ALEXANDER, J. & VICKERMAN, K. — Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* infect macrophages. *J. Protozool.*, 22: 502-508, 1975.
3. ARCAJ, L. — Influencia de las hormonas sexuales sobre la infección experimental producida por una cepa de *Leishmania mexicana amazonensis* de Venezuela. *Rev. lat-amer. Microbiol.*, 27: 195-207, 1985.
4. ARCAJ-DE-PERAZA, L.; OCHOA, N. & ERCOLI, N. — Nuevas lesiones genitales ocasionadas por *Leishmania mexicana amazonensis*. *Acta cient. venez.*, 29: 34-41, 1978.
5. BASTARDO, T.; ARCAJ, L. & TEJERO, F. — Interaction of avirulent *Leishmania* species with rat peritoneal macrophages. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 78: 21-26, 1983.
6. BRUZUAL, E. & ARCAJ, L. — Visceralización generalizada de *Leishmania mexicana amazonensis* en hamsters y ratones, bajo la influencia de la quimotripsina, 1985. (en prensa)
7. BIANCO, C.; GRIFFEN, F. N. & SILVERSTEIN, S. C. — Studies on macrophages complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. exp. Med.*, 141: 1278-1290, 1975.
8. BRAY, R. S. — *Leishmania mexicana mexicana*: attachment and uptake of promastigotes and macrophages in vitro. *J. Protozool.*, 30: 314-322, 1983a.
9. BRAY, R. S. — *Leishmania*: Chemotaxic responses of promastigotes and macrophages in vitro. *J. Protozool.*, 30: 322-329, 1983b.
10. COUTINHO, E. & COELHO, M. V. — Experimental Cutaneous Leishmaniasis. II. The pathology of Leishmaniasis by *L. mexicana*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 7: 145-155, 1965.
11. CUATRECASAS, P. & HOLLEMBERG, M. D. — Membrane receptors and hormone action. *Advanc. Protein Chem.*, 30: 251-451, 1976.
12. CHANG, K. P. — Endocytosis of *Leishmania*-infected macrophages, fluorometry of pinocytotic rate, lysosome phagosome fusion and intralysosomal pH. In: VAN DEN BOSSCHE, H., ed. — *The host invader interplay*. Jansen Research Foundation. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. p. 231-234.
13. CHANG, K. P. & DWYER, D. M. — *Leishmania donovani* hamster peritoneal macrophage interactions in vitro. *J. Parasit.*, 61 (Suppl.): 71, 1975.
14. GIANNINI, M. S. H.; D'ALESSANDRO, F. A.; GARCIA, C. R. & SARAIVA, E. M. B. — Failure of hamster macrophages to discriminate between infective and non infective promastigotes of *Leishmania donovani* during attachment in vitro. *Infect. Immun.* 34: 629-632, 1981.
15. GUIMARAES, F. N. — Leishmaniose experimental. Visceralização de *Leishmania brasiliensis* Vianna, 1911 em hamsters (*Cricetus auratus* Waterhouse). *Brasil méd.*, 61: Separatim, 47-48, 1947.
16. GUIMARAES, F. N. — Leishmaniose experimental. II. Comportamento de *L. brasiliensis* Vianna 1911 em hamsters (*Cricetus (Mesocricetus) auratus* Waterhouse). *Hospital (Rio de J.)*, 40: 25-45, 1951a.
17. GUIMARAES, F. N. — Leishmaniose experimental. III. a) Comportamento de *L. brasiliensis* em camundongo (*Mus musculus albina*). b) Infecções ligeiras em cotton-rats (*Signodon hispidus*). c) Animais refractórios. *Hospital (Rio de J.)*, 40: 153-162, 1951b.
18. GUIMARAES, F. N. — Leishmaniose experimental. IV. Reprodução em hamsters (*Cricetus auratus*) de uma leishmaniose cutânea nódulo-tumoral oriunda da Amazonia. *Hospital (Rio de J.)*, 40: 665-676, 1951c.
19. GUIMARAES, F. N. — Leishmaniose experimental. V. Reprodução em camundongos (*Mus musculus albina*) de uma leishmaniose cutânea nódulo-tumoral (histiocitoma leishmânico), ocorrendo na Amazonia. *Hospital (Rio de J.)*, 40: 919-931, 1951d.
20. HERMAN, R. — Cytophilic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice. *Infect. Immun.*, 28: 585-593, 1980.
21. HERNANDEZ, A. G.; INFANTE, R. B.; LA RIVA, G. de V. O.; DAWIDOWICZ, K. & CONVIT, J. — The surface membrane of *Leishmania*. II. Energy dependent agglutination of *Leishmania brasiliensis* by concanavalin A. *Acta cient. venez.*, 28: 380-384, 1977.
22. KEUSCH, G. T. — Specific membrane receptors: pathogenetic and therapeutic implications in infectious diseases. *Rev. infect. Dis.*, 1: 517-529, 1979.
23. KEUSCH, G. T. — The role of bacterial adherence in infection. In: MAGNO, G.; COTRAN, R. S. & KAUF-

- MAN, N., ed. — *Current topics in inflammation*. Baltimore, William & Wilkins, 1982. p. 94-113.
24. LEWIS, D. H. & PETERS, W. — The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 71: 295-312, 1977.
25. MEDINA, R. & ROMERO, J. — *Leishmania pifanoi* n. sp., el agente causal de la leishmaniasis tegumentaria difusa. *Arch. venez. Med. trop.*, 4: 349-353, 1962.
26. OCHOA DE MACHADO, N. & ARCAY-DE-PERAZA, L. — Diseminación de *Leishmania mexicana amazonensis* mediante la inoculación intracardiaca, bajo la influencia de la acción de la mucina gástrica. *Acta cient. venez.*, 29: 119-125, 1978.
27. SILVERSTEIN, S. C. — Endocytic uptake of particles by mononuclear phagocytes and the penetration of obligate intracellular parasites. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 26: 161-169, 1977.
28. SCHNUR, L. F.; ZUCKERMAN, A. & MONTILLO, B. — Dissemination of leishmaniasis to the organs of Syrian hamsters following intrasplenic inoculation of promastigotes. *Exp. Parasit.*, 34: 432-447, 1973.
29. STAUBERT, L. A. — *Leishmaniasis in hamsters*. In: *Some-physiological aspects and consequences of parasitism*. New Brunswick, Rutgers Univ. Press, 1955. p. 76-90.
30. SUTTER, E. — Multiplication of tubercle bacilli within mononuclear phagocytes in tissue culture derived from normal animal vaccinated with BCG. *J. exp. Med.*, 97: 235-245, 1953.
31. WERB, Z. — Phagocytic cells: chemotaxis and effects function of macrophages and granulocytes. In: WITZ, I. P. & HANDA, M. O., ed. — *Contemporary topics in immunobiology*. New York, Plenum, 1981. p. 109-123.
32. WONDE, M. M. T. & LAMY, L. — Differences de comportement de *Leishmania donovani* dans les macrophages de souris, de rat et hamster *in vivo* et *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. (Paris) (Serie D)* 265: 810-813, 1967.
33. WYLER, D. & SUZUKI, R. — *In vitro* parasite-monocyte interaction in human leishmaniasis: effect of enzyme treatments on attachment. *Infect. Immun.*, 42: 356-361, 1983.
34. ZENIAN, A.; ROWLES, P. & GINGELL, D. — Scanning Electron-microscopic study of the uptake of *Leishmania* parasites by macrophages. *J. Cell. Sci.*, 39: 187-199, 1979.
35. ZUCKERMAN, A. — Current status of the immunology of blood and tissue protozoa. I. *Leishmania*. *Exp. Parasit.*, 38: 370-400, 1975.

Recebido para publicação em 17/4/1985.

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITARIAS

Será realizado nos meses de abril, maio e junho de 1987 o Curso de Especialização em Doenças Infecciosas e Parasitárias, promovido pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, destinado exclusivamente a médicos formados.

O critério de avaliação para aceite dos candidatos será através de "curriculum vitae".

Maiores informações serão divulgadas em ocasião oportuna.