

Susceptibilidad de distintas cepas de ratones a la infección por *Leishmania amazonensis*

Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection

María Alejandra Falú¹, María Fernanda García Bustos², Cecilia María Parodi Ramoneda³, Ema Molina de Raspi⁴, Rubén Marino Cardozo⁵, Rubén Cimino⁶, José Fernando Gil⁷, Jorge Leonardo Vasvari⁸, Miguel Angel Basombrió⁹

Trabajo ganador: Premio Beca de Investigación - SAD 2007

Resumen

Antecedentes. En el modelo murino más estudiado, producido por *L. major*, se observa correlación entre cepas resistentes (C57BL/6) y susceptibles (BALB/c), con respuestas inmunes Th1 o Th2, respectivamente. Esta dicotomía no se observa en modelos desarrollados con otras especies de *Leishmania* (*L.*). Por ello es importante avanzar en el estudio de modelos experimentales con especies predominantes de nuestra zona. El objetivo fue reproducir la enfermedad en diferentes cepas murinas luego de la infección por *L. amazonensis*.

Métodos. Para conocer el efecto de la variable cepa de ratones sobre la susceptibilidad a la infección por *L. amazonensis*, se aplicó un inóculo constante del parásito a las cepas en estudio. Se evaluó la respuesta de las cepas C57BL/6, BALB/c y Swiss, por medición de lesiones, estimación de carga parasitaria e histopatología. Por ELISA se determinaron anticuerpos y citoquinas en suero. Test estadístico: análisis de la varianza (ANOVA).

Resultados. BALB/c demostró máxima susceptibilidad a la infección; Swiss presentó un fenotipo intermedio, y C57BL/6 fue la menos susceptible. Se obtuvieron modelos murinos que reprodujeron distintas formas clínicas comparables a la enfermedad humana.

Conclusiones. Los resultados servirán para extrapolar a la patología humana las conclusiones de posteriores ensayos terapéuticos y profilácticos sobre animales experimentales (Dermatol Argent 2009;15(5):334-339).

Palabras clave: *L. mexicana*, modelos animales, ratones.

Abstract

Background. Most studies have been based on *L. major* mouse models, where Th1 and Th2 immune responses are associated with resistant (C57BL/6) and susceptible (BALB/c) strains, respectively. This dichotomy is not generally observed in models developed with other *Leishmania* (*L.*) species. Therefore, the study of mouse models involving species responsible for human infections in our region represents an important challenge. The aim was to induce the disease in different mouse strains after the infection with *L. amazonensis*.

Methods. To study the effect of "mice strain" variable over "susceptibility for *L. amazonensis* infection", a constant parasite inoculum was applied to the studied mice strains. Response to infection was characterized in C57BL/6, BALB/c, and Swiss strains by lesion measurement, parasitic load estimate and histological analysis. Serum presence of antibodies and cytokines was determined by ELISA. Statistical analysis: ANOVA test.

Results. BALB/c showed the maximum level of susceptibility towards the infection. Swiss demonstrated an intermediate phenotype and C57BL/6 was the most resistant strain. We could obtain murine models reflecting different clinical forms present in human disease.

Conclusions. These results will be useful to extrapolate to human pathology future conclusions about therapeutic and prophylaxis analysis on experimental models (Dermatol Argent 2009;15(5):334-339).

Key words: *L. mexicana*, animal models, mice.

Fecha de recepción: 16/5/09 | **Fecha de aprobación:** 30/7/09

1. Médica especialista en Dermatología y especialista en Salud Pública. Jefa de Trabajos Prácticos (JTP), Cátedra de Anatomía y Fisiología, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta (FCsSa-UNSa).
2. Médica cirujana. Becaria Doctoral Tipo II del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Instituto de Patología Experimental (IPE), FCsSa-UNSa. JTP, Cátedra de Anatomía y Fisiología, FCsSa-UNSa.
3. Doctora en Virología. Becaria Postdoctoral del CONICET. IPE. FCsSa-UNSa.
4. Médica anatomopatóloga. Prof. Adjunta Cátedra de Fisiopatología, FCsSa-UNSa.
5. Lic. en Biología. IPE, FCsSa-UNSa.
6. Lic. en Biología. Especialista en Salud Pública. Cátedra de Química Biológica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, UNSa.
7. Lic. en Biología. Becario Doctoral Tipo I del CONICET. Cátedra de Química Biológica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, UNSa.
8. Médico especialista en Dermatología.
9. Doctor en medicina. Investigador principal del CONICET. IPE. FCsSa-UNSa.

Correspondencia

María Alejandra Falú: Alazán 10, (4400) Altos de San Lorenzo, Salta, Rep. Argentina. alejandrafalu@hotmail.com

Introducción

Los parásitos protozoarios del género *Leishmania* (*L.*) causan un amplio espectro de enfermedades, conocidas en conjunto como leishmaniasis. *L. braziliensis* es en nuestro medio el agente etiológico principal de la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), pero no es el único: *L. amazonensis* y *L. guyanensis* se han descrito también como especies circulantes en la provincia de Salta.¹⁻³

Los modelos murinos de leishmaniasis cutánea (LC) son herramientas valiosas para estudiar los distintos mecanismos relacionados con la enfermedad. La amplia variedad de especies de *Leishmania* responsables de la LTA humana, combinada con los mecanismos inmunes del hospedador, producen un gran espectro de manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunopatológicas, así como diferentes respuestas terapéuticas a los fármacos convencionales. El modelo murino mayormente estu-

diado es el producido por *L. major*, donde determinadas cepas de ratones presentan mayor resistencia a la infección (C57BL/6) y otras son más susceptibles (BALB/c). En este modelo, hay correlación entre un perfil de respuesta inmune celular tipo Th1 predominante en las cepas más resistentes y un perfil tipo Th2 en las de mayor susceptibilidad.⁴⁻⁶ Esta dicotomía no se observa en otros modelos desarrollados con otras especies de *Leishmania*. Por ejemplo, modelos de infección con *L. braziliensis* muestran que tanto las cepas BALB/c como C57BL/6 son capaces de lograr la curación espontáneamente.⁷ En el caso de la infección experimental por especies del complejo de *L. mexicana*, tal como *L. amazonensis*, tampoco se observa la relación entre resistencia y susceptibilidad con respuestas Th1 o Th2 predominantes. No obstante, las observaciones obtenidas por diferentes grupos no siempre son coincidentes, lo cual indica diferentes grados de susceptibilidad y resistencia entre las cepas de ratones mencionadas.⁸⁻¹⁰ Por otra parte, la LC causada por *L. major* en el hombre es usualmente benigna: produce una lesión cutánea localizada que eventualmente cura de manera espontánea y promueve inmunidad de por vida a una reinfección. La enfermedad causada por *L. amazonensis*, en cambio, se distingue por su cronicidad, latencia y tendencia a desarrollar metástasis en la mucosa nasal.¹¹

Los modelos murinos son capaces de reflejar rasgos clínicos e histopatológicos similares a los que se producen en la infección humana. Debido a esto, y a las controversias que se observan en diferentes estudios sobre el tema, es que resulta de gran importancia avanzar en el estudio de modelos experimentales con especies predominantes en nuestra zona. Nuestro objetivo fue reproducir la enfermedad en diferentes cepas de ratones para demostrar distinta susceptibilidad a la infección por *L. amazonensis*, especie circulante en la provincia de Salta.

Materiales y métodos

Diseño. A los fines de conocer el efecto de la variable cepa de ratones sobre la susceptibilidad a la infección por *L. amazonensis*, se aplicó un inóculo constante del parásito a los ratones de las muestras de cada cepa estudiada.

Población. Se utilizaron dos cepas de ratones endocriados (BALB/c y C57BL/6) y una cepa de ratones exocriados (Swiss), machos, de 4 meses de vida.

Muestra. Se utilizaron 6 ratones por cada grupo experimental y como grupo control 6 ratones de cada cepa no infectados.

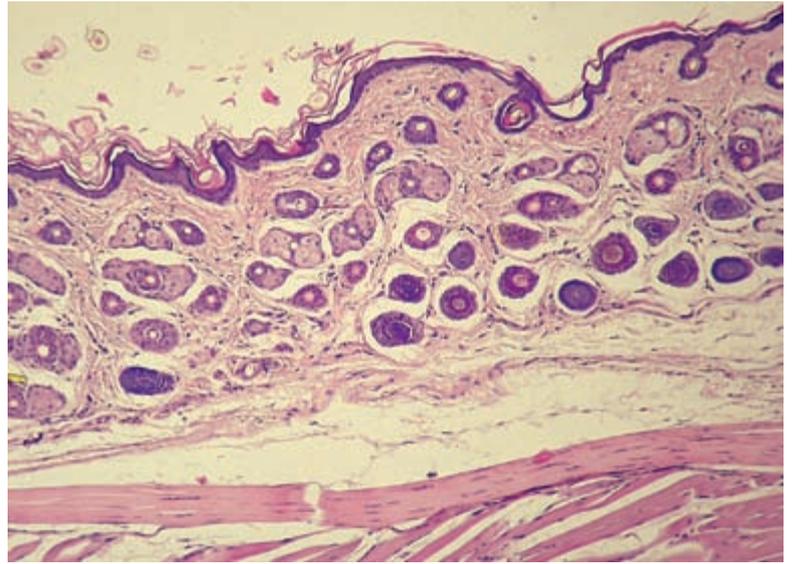


Foto 1. Piel normal de almohadilla plantar de ratón BALB/c. Se observa el aspecto de la epidermis y la dermis, con abundantes glándulas sudoríparas. Subyacente a la dermis, parte del tejido muscular (H-E, x10).

Cultivo de los parásitos, inoculación subcutánea, y medición de las lesiones. Parásitos de una cepa de *L. amazonensis* (Instituto de Biomedicina, UCV, Min. de Salud y Desarrollo Social, Caracas, Venezuela) se mantuvieron por pasajes seriados en la almohadilla plantar derecha (APD) de ratones BALB/c. Su aislamiento se realizó sembrando el homogenado de APD en medio USMARU modificado (fase sólida de agar base sangre, que contenía 15% de sangre de conejo desfibrinada y hemolizada y solución salina glucosada al 1%). Se utilizaron los pases del primero al octavo. Durante la fase exponencial, luego de 3 días de cultivo (a temperatura ambiente y en oscuridad) se realizó la cosecha y el lavado (solución salina bufferada estéril [PBS] 1X, pH=7,2 con 100 UI/ml de penicilina/estreptomina) de los parásitos. Éstos (promastigotes en fase exponencial) se re-suspendieron en PBS a una concentración de 2×10^7 /ml. Se inocularon vía subcutánea 10^6 parásitos por animal experimental en un volumen de 50 μ l en APD. A partir del día 7 y hasta el día 78 posinfección, se determinó la tumefacción progresiva (granuloma) producida por el inóculo infeccioso. Esto se realizó a través de la medición de las dos patas traseras de los ratones mediante calibre submilimétrico especial y cálculo de la diferencia (Δ) entre ambas patas.

Estimación de la carga parasitaria en bazo: índice esplénico. Se calculó mediante la relación entre el peso del bazo y el peso corporal del animal. Además, se realizó la preparación y coloración (May-Grünwald-Giemsa) de improntas de cortes de bazo para determinar la presencia de amastigotes en ese órgano.

Histología. Se realizó a las 11 semanas posinfección. Los sitios primarios de infección (APD) fueron removidos, fijados en formol al 10%, procesados (luego de 12-24 horas) e incluidos en parafina. Cortes de un grosor de 5 μ m se colorearon con hematoxilina-eosina.

Homogenado proteico de parásitos de *Leishmania*. Formas promastigotes de *L. amazonensis* fueron cultivados a 25 °C en medio de cultivo LITHSP que contenía 20% de suero bovino fetal, penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 g/ml). Los parásitos fueron concentrados por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. Se trató el pellet con PBS-BSA 0,1% (*buffer phosphate saline - bovine serum albumin*), tres veces. El extracto de la frac-

ción soluble fue obtenido por lisis del pellet usando buffer de lisis (Tris base 50 mM pH=8, EDTA 1 mM, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride [PMSF] 0,1% Triton $\times 100$) y agregado de sacarosa (10% concentración final). El lisado de parásitos fue centrifugado a 20000 $\times g$ durante 60 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante (homogenado soluble) y se separó una alícuota para la cuantificación por el método de Bradford.¹² El sobrenadante se conservó a -20 °C hasta su uso.¹³

Ensayo serológico inmunoenzimático (ELISA). Se usaron 2 mg por pocillo (en placas de poliestireno) de un homogenado proteico de *L. amazonensis*. Para la adhesión a la placa, los antígenos se diluyeron en buffer sodio carbonato (pH=9,6) y se incubaron a 4 °C (12 hs). El bloqueo se realizó con PBS-leche descremada 5% (1 hora, temperatura ambiente). Se adicionó el suero en una dilución 1/25 en PBS-leche 1% durante 1 hora (temperatura ambiente). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El anticuerpo 2rio de ratón (anti-IgG total marcado con biotina, SIGMA) se usó en una dilución 1:2500, incubando las placas 30 minutos. Luego de 3 lavados (0,1% PBS-Tween) se agregó el conjugado en dilución 1:2000 por 30 minutos. Se utilizó ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno y H₂O₂ al 30% (SIGMA) como sustrato diluidos en buffer citrato (pH=5,3). Al cabo de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 M. La lectura de las microplacas se realizó a 490 nm.¹⁴⁻¹⁶

Determinación de citoquinas proinflamatorias y reguladoras en suero. Muestras de suero de los distintos grupos experimentales fueron obtenidas a los días 15, 22 y 80 posinfección y conservadas a -20 °C hasta su uso. El dosaje de IFN- γ (15-2000 pg/ml), IL-12 (15-2000 pg/ml) e IL-4 (4-500 pg/ml) en dichas muestras se realizó por ensayo inmunoenzimático (ELISA), siguiendo las instrucciones del fabricante (ebioscience, San Diego, EE.UU.).

Análisis estadístico. La tumefacción progresiva de la pata fue analizada mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas; incluyó la significación estadística para el efecto de los tratamientos (cepa) y progreso de la tumefacción (tiempo), así como la interacción entre ambos. Para determinar el momento en que la tumefacción comenzó a ser diferente según la cepa, se realizó una comparación de medias mediante contrastes ortogonales. El índice esplénico y los datos de la serología del factor cepa fueron comparados por ANOVA de una vía de clasificación. Para todas las inferencias fue fijado $\alpha = 0,05$ por debajo del cual fue rechazada la hipótesis nula de igualdad; en tal caso se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$) para verificar en dónde se concentraban las diferencias. La normalidad distributiva de los datos fue verificada por la prueba de Shapiro-Wilk.

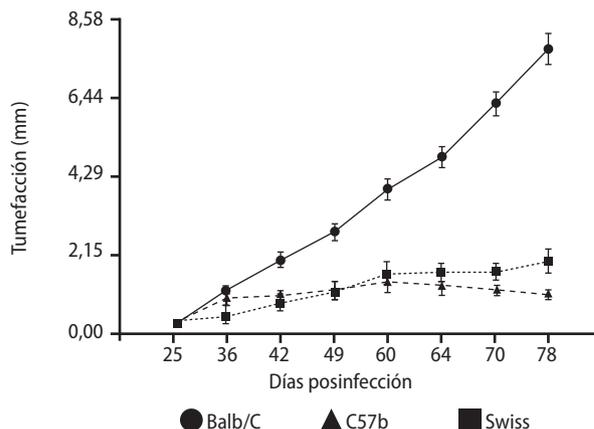


Gráfico 1. Progresión en el tiempo de la tumefacción en APD de cada una de las cepas de ratones infectados con *L. amazonensis*.

Resultados

Comparación de la tumefacción en diversos días posinfección.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$; ANOVA para muestras repetidas) entre las distintas cepas en estudio. Los ratones de la cepa BALB/c presentaron una tumefacción promedio de diámetro significativamente mayor a la de las cepas C57BL/6 y Swiss (**Gráfico 1**). Esta diferencia comenzó a ser significativa a partir del día 49 posinfección, y se extendió hasta el final del estudio (día 78 posinfección). La tumefacción progresiva desarrollada por las cepas C57BL/6 y Swiss, en cambio, fue similar a lo largo del período analizado.

Comparación del índice esplénico (IE). El índice esplénico se utilizó como un indicador del avance de la enfermedad, y por lo tanto, del grado de susceptibilidad a la infección. Analizando los distintos grupos de ratones infectados experimentalmente, junto a sus respectivos grupos control (ratones sanos), mediante el test de ANOVA se demostró que existen diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre el IE promedio de los distintos grupos estudiados. No obstante, utilizando el test de Tukey, esta diferencia solo fue evidenciada en el grupo de ratones infectados de la cepa BALB/c respecto de los restantes animales (grupos experimentales C57BL/6 y Swiss infectados, y controles sanos de las tres cepas; véase **Cuadro 1**). Por otra parte, en coincidencia con estos resultados, el grupo de ratones infectados de la cepa BALB/c fue el único en el que se evidenció la presencia de amastigotes en bazo, aunque en escasa proporción.

Anatomía patológica del bazo y del sitio primario de infección.

En el grupo BALB/c, las APD presentaron piel con amplia ulceración, abscedación e infiltrado inflamatorio crónico reagu-

CUADRO 1. VALORES DE ÍNDICE ESPLÉNICO PROMEDIO (MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR) EN RATONES DE DISTINTAS CEPAS (INFECTADOS CON *L. AMAZONENSIS* Y NO INFECTADOS).

Swiss	Swiss (control)	C57BL/6	C57BL/6 (control)	BALB/c	BALB/c (control)	p
2,51 ^a \pm 0,24	3,02 ^a \pm 0,26	2,66 ^a \pm 0,10	2,45 ^a \pm 0,11	7,34 ^b \pm 1,42	2,67 ^a \pm 0,19	< 0,0001

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

dizado moderado a severo que invade la dermis, además de abundantes macrófagos cargados con parásitos (Fotos 1 a 6; la Foto 1 es una microfotografía de piel normal para observar el contraste). El bazo se presentó con abundantes focos de reacción inflamatoria crónica y moderada cantidad de amastigotes. En el grupo Swiss, las APD presentaron abscedación de la piel, con abundante cantidad de *Leishmania*; mientras que en bazo se observaron macrófagos con escasos parásitos. En el grupo C57BL/6, en cambio, las APD mostraron granulomas, con escasa o nula cantidad de amastigotes. En el bazo de estos ratones se observaron macrófagos con escasa o nula cantidad de *Leishmania*.

Comparación de los datos de serología. Este análisis demostró que los valores de densidad óptica (DO) promedio fueron significativamente diferentes ($p = 0,029$) entre algunas de las tres cepas de ratones estudiadas. La prueba de Tukey determinó que la DO promedio encontrada en los ratones de la cepa Swiss fue significativamente mayor a la de C57BL/6, mientras que la DO promedio de BALB/c no expresó diferencias en relación a ellas. Todos los ratones correspondientes a los grupos control presentaron resultados negativos (Gráfico 2).

Citoquinas proinflamatorias y reguladoras en suero. En todos los casos y tiempos analizados, los resultados obtenidos se encontraron debajo del límite de detección de la técnica utilizada.

Comentarios

Los hallazgos anatomopatológicos encontrados se correlacionan con los hallazgos clínicos en cuanto al grado de tumefacción del sitio de lesión y a los índices esplénicos determinados. En los ratones BALB/c infectados observamos gran reacción inflamatoria y abundante cantidad de parásitos en APD, lo que se correlaciona clínicamente con grandes y progresivas tumefacciones. En bazo también visualizamos gran reacción inflamatoria, con moderada cantidad de parásitos, lo cual coincide con el mayor índice esplénico encontrado respecto de las otras dos cepas estudiadas. Estos datos indican una marcada susceptibilidad de la cepa BALB/c hacia la infección por *L. amazonensis*. Al analizar los resultados correspondientes a la cepa Swiss, encontramos también inflamación y abundante cantidad de parásitos en las APD, lo cual coincide con un desarrollo progresivo de las lesiones,^a pero que reviste menor intensidad que el determinado en la cepa BALB/c. Además,

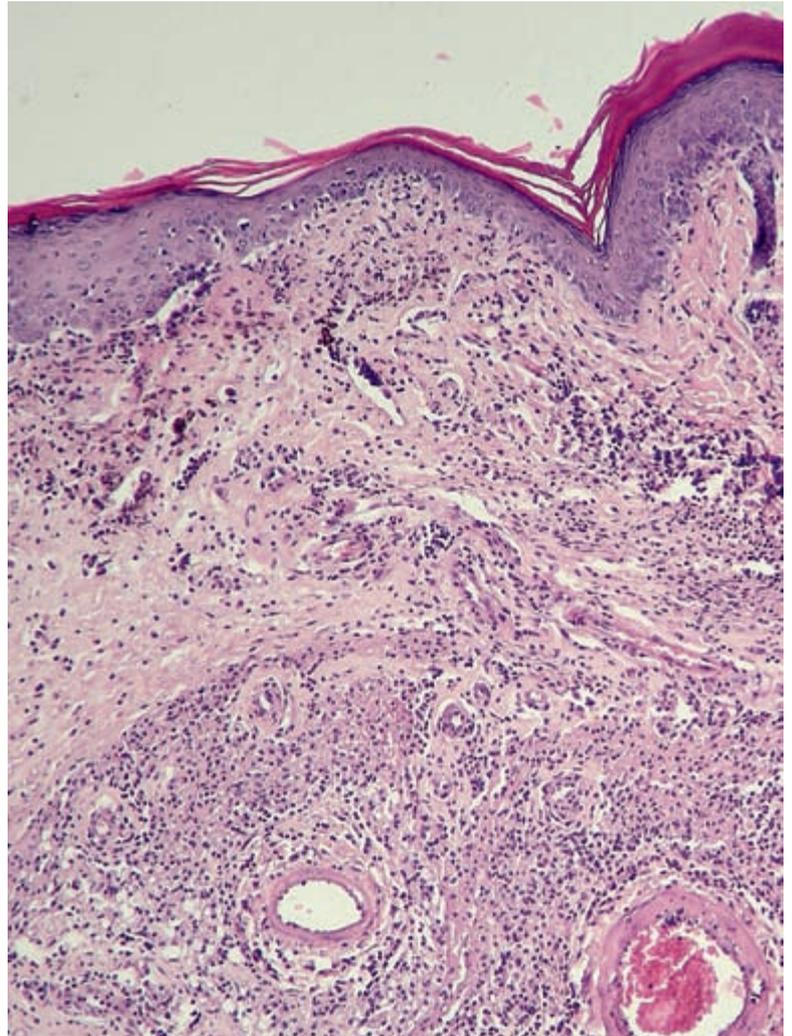


Foto 2. Piel de almohadilla plantar de ratón BALB/c, inoculado con *L. amazonensis* y sacrificado a las 11 semanas posinfección. Se observa infiltrado inflamatorio crónico en la dermis, con signos de vasculitis (H-E, x10).

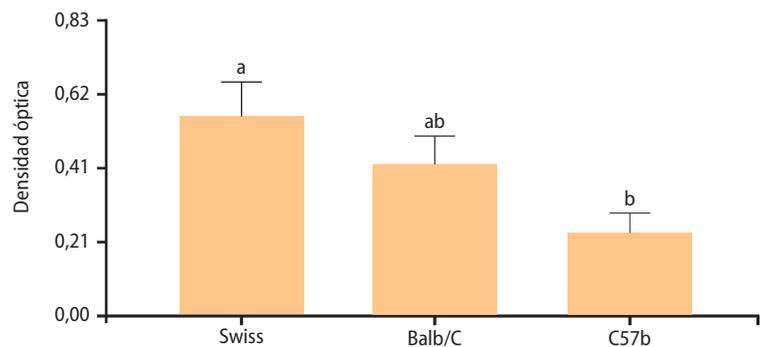


Gráfico 2. Valores de DO promedio (\pm error estándar) encontrados en ratones de distintas cepas inoculados con *L. amazonensis*. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

^a Si bien la progresión de la tumefacción de APD en Swiss no presenta diferencias significativas con la de C57BL/6, la tendencia de las curvas es distinta, lo cual puede objetivarse en el Gráfico 1: tendencia a la progresión en Swiss, y tendencia a la regresión en C57BL/6. Tal vez si se hubiera hecho un análisis más tardío en el tiempo, esto se podría haber puesto de manifiesto significativamente.

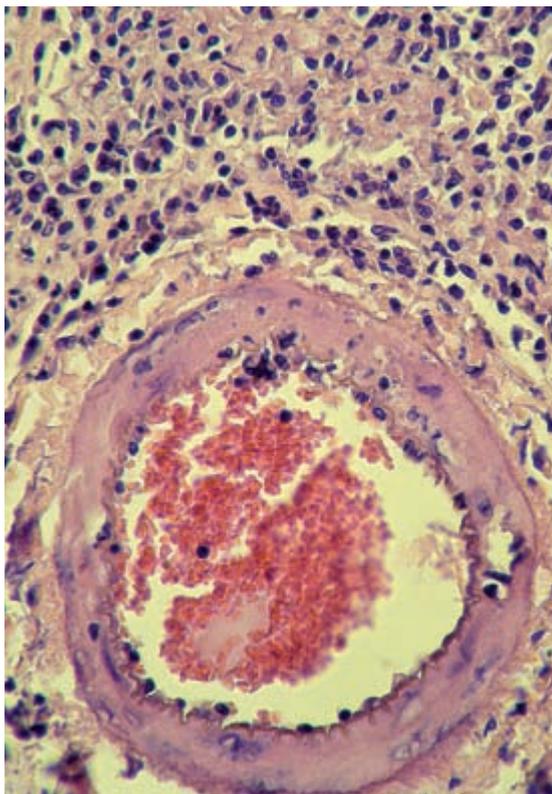


Foto 3. Vista amplificada por zoom de un segmento del cuadrante inferior derecho de la Foto 2, en donde se observa con más detalle el infiltrado inflamatorio dérmico y periarteriolar.

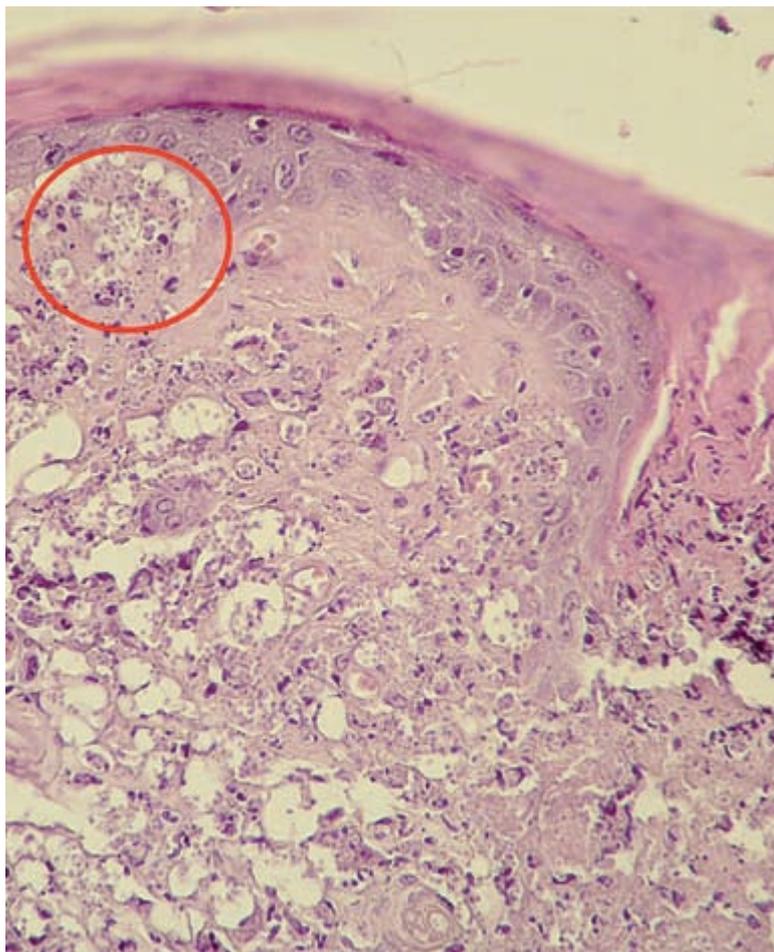


Foto 4. Piel de almohadilla plantar de ratón BALB/c, inoculado con *L. amazonensis* y sacrificado a las 11 semanas posinfección. Se observa en este corte el infiltrado inflamatorio dérmico crónico, junto a una abundante cantidad de amastigotes de *Leishmania*. **Círculo:** foco subepidérmico con macrófagos cargados de amastigotes (H-E, x40).

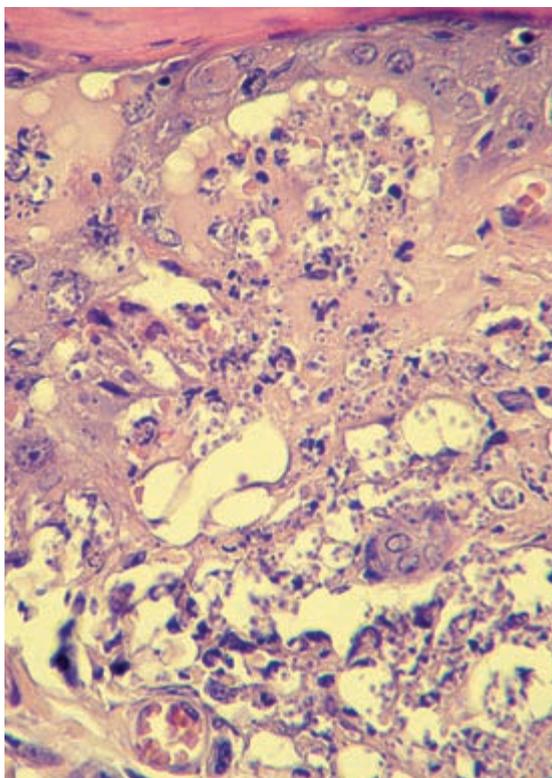


Foto 5. Vista amplificada por zoom del segmento de la Foto 4 encerrado con un círculo. Se observan con más detalle los macrófagos cargados con *Leishmania*.

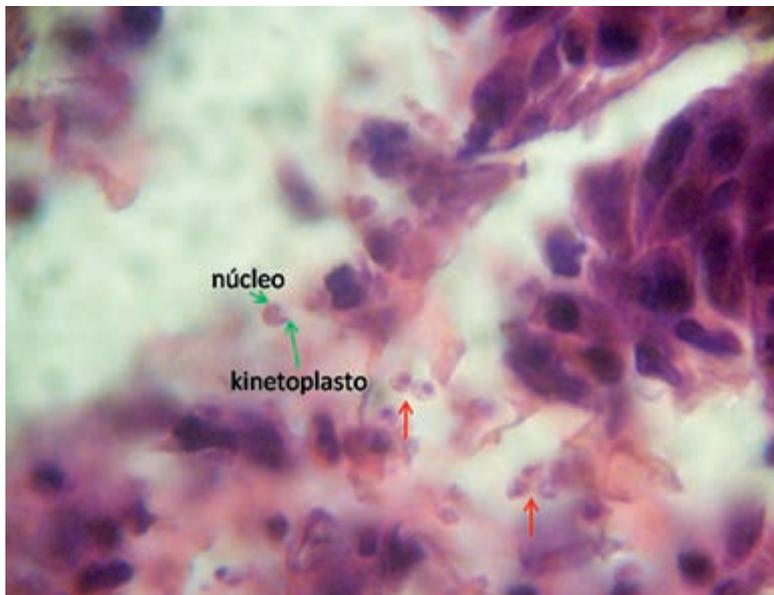


Foto 6. Amastigotes de *L. amazonensis* con localización subepidérmica, en almohadilla plantar de ratón BALB/c infectado (**flechas en rojo**). Se observa claramente su morfología, destacándose el núcleo y el kinetoplasto (**flechas en verde**) (H-E, x100).

el bazo de los ratones Swiss se presenta con una escasa cantidad de *Leishmania*, lo cual se correlaciona con un índice esplénico menor. Por último, en el grupo C57BL/6 se observa escasa cantidad de parásitos en APD y en bazo, tumefacciones en vías de regresión y un índice esplénico bajo. Estas observaciones clínicas e histológicas de la cepa C57BL/6 se relacionan con menor susceptibilidad a la infección por *L. amazonensis*.

Por otra parte, en diferentes estudios realizados durante la infección por diferentes especies de *Leishmania* en humanos y en modelos experimentales murinos, se ha observado que un aumento en los niveles de IgG total se correlacionaría no sólo con fallas para proveer protección sino que también contribuiría a la progresión de la enfermedad, mientras que una disminución de los títulos se asociaría a mejoría o a efectividad del tratamiento.^{17,18} El crítico papel de los anticuerpos circulantes en la patogénesis fue también observado en la infección por *L. amazonensis*.¹⁹ En el presente trabajo, los hallazgos serológicos apoyan a los hallazgos clínicos encontrados, ya que las dos cepas en las que se observa progresión de la enfermedad (Swiss y BALB/c) presentan valores de DO promedio superiores a los obtenidos en los sueros de C57BL/6. Si bien en el caso de la cepa Swiss estas diferencias son estadísticamente significativas, en la cepa BALB/c también se demuestra esta tendencia. En cuanto a los niveles de producción de citoquinas séricas de tipo Th1 y Th2 en el modelo propuesto, resultarían demasiado bajos para lograr su detección mediante la técnica utilizada (determinación en suero), no solo en tiempos tempranos sino también prolongados de infección.

En resumen, a través de la caracterización de la infección en cada una de las cepas de ratones, obtuvimos modelos murinos que presentan diferentes grados de resistencia y susceptibilidad hacia la infección por *L. amazonensis*. A su vez, estos modelos reprodujeron distintas formas clínicas comparables al espectro de la enfermedad humana. Estos resultados serán de utilidad para profundizar en los mecanismos relativos al hospedador capaces de regular la respuesta a la infección, y para extrapolar a la patología humana las conclusiones de posteriores ensayos terapéuticos y profilácticos sobre animales experimentales.

Referencias

- Frank FM, Fernández MM, Taranto NJ, Cajal SP, et al. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* 2003;126:31-39.
- Marco JD, Barroso PA, Calvopiña M, Kumazawa H, et al. Species assignment of *Leishmania* from human and canine American Tegumentary Leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:606-611.
- Segura EL, Juan N, Piquín ALM, Cuba Cuba CA, et al. Molecular and biologic characterization of *Leishmania* parasites implicated in an epidemic outbreak in northwestern Argentina. *Parasitol Res* 2000;86:504-508.
- Scott P, Farrell JP. Experimental cutaneous Leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol* 1998;70:60-80.
- Von Stebut E, Udey MC. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect* 2004;6:1102-1109.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002;2:845-858.
- Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in mice. *Infect Immun* 2007;75:3823-3832.
- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolillo SM, Cardoso FO, et al. Histopathological studies of visceralized *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 2004;121:179-187.
- Diaz NL, Fernández M, Figueira E, Ramírez R, et al. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous Leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:288-293.
- Aguilar Torrentera F, Lambot MA, Laman JD, Van Meurs M, et al. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania Mexicana*. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:273-279.
- Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, et al. Geographic distribution and clinical description of Leishmaniasis cases in Perú. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:312-317.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Nasser JR. Proteínas recombinantes del *Trypanosoma cruzi* con actividad inmunogénica: respuesta inmune celular y humoral. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán 1997. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo.
- de Padua Vidigal C, Marcussi V, Marcussi L, Mikcha J. Enzyme Immunoassay using *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* antigens for laboratory diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis. *Acta Trop* 2008;107:208-212.
- Ferreira M, Roselino A, Nascimento M, Aires J, et al. Sensivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:215-217.
- Voller A, Draper C, Bidwell D, and Bratlett A. Microplate Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Chagas disease. *Lancet* 1975;1:426-429.
- Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 2005;201:747-754.
- Afonso-Cardoso SR, Rodrigues FH, Gomes MA, Silva AG. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Korean J Parasitol* 2007;45:255-266.
- Kim PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous Leishmaniasis. *J Exp Med* 2000;191:1063-1068.