

2019

Evaluación de lesiones provocadas por cuatro cepas de *Leishmania* en ratones de la cepa BALB/c

Olga Patricia Fuya Oviedo
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Fuya Oviedo, O. P. (2019). Evaluación de lesiones provocadas por cuatro cepas de *Leishmania* en ratones de la cepa BALB/c. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/63>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Evaluación de lesiones provocadas por cuatro cepas de *Leishmania* en ratones de la cepa BALB/c

OLGA PATRICIA FUYA OVIEDO
Grupo de Biofísica y biología de membranas
Universidad Nacional de Colombia

PROGRAMA BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
UNIVERSIDAD DE LA SALLE

2019

Evaluación de lesiones provocadas por cuatro cepas de *Leishmania* en ratones de la cepa BALB/c

Trabajo presentado para optar al título de Bióloga

**ESTUDIANTE:
OLGA PATRICIA FUYA OVIEDO.
Grupo Biofísica y biología de membranas**

**TUTOR:
MARÍA MARCELA CAMACHO NAVARRO M.D. Ph.D.
Profesora titular, Universidad Nacional de Colombia
Grupo de Investigación: Biofísica y biología de membranas
Universidad Nacional de Colombia**

**Cotutor:
ANGELA CRISTINA ZAPATA LESMES Biol.M.Sc. Ph.D.
Directora Departamento de Ciencias Básicas
Universidad de La Salle**

**PROGRAMA BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE LA SALLE**

2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis padres por apoyarme en cada paso que doy, a mi hija Sofia por su paciencia y comprensión, a mi esposo Nestor Pinto por impulsarme y acompañarme a alcanzar nuevas metas.

A la Universidad de La Salle por aportar a mi formación académica, especialmente a la Dra. Angela Cristina Zapata, cotutora del trabajo y apoyo académico y humano en todo momento.

A la Universidad Nacional, especialmente a la Dra. Marcela Camacho por aceptar la tutoría de mi trabajo de grado, por sus enseñanzas y valiosos aportes en el documento final.

A las directivas del Instituto Nacional de Salud por permitirme el tiempo para mis estudios, al personal del Bioterio, del grupo de Parasitología y del grupo de Patología, por su apoyo técnico para desarrollar análisis de las muestras y de información.

A los jurados de mi trabajo de tesis, Dra. Martha Ayala y Adriana Castillo por su apoyo en la revisión del documento y por su tiempo.

RESUMEN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades tropicales causadas por parásitos del género *Leishmania*, que ponen en riesgo de infección a 350 millones de personas. El amplio rango de manifestaciones clínicas se ha atribuido a la variabilidad tanto en la especie y virulencia del parásito como en la respuesta inmune del hospedero. El grupo de investigación de Biofísica y Biología de Membranas de la Universidad Nacional de Colombia ha estado interesado en entender cuáles moléculas del promastigote se asocian con la función de la bomba de protones que favorece la entrada de glucosa y aminoácidos por transporte activo secundario, así como la adaptación de la forma amastigote al pH ácido, del compartimiento donde está confinado que implican proteínas asociadas con transporte de cloruro. Por esta razón se inició el estudio de proteínas de la familia CLC de *Leishmania*, transportadores de cloruro que además se asocian con regulación de volumen. Estos estudios permitieron postular este grupo de proteínas como blanco terapéutico potencial. Más aún que cepas transfectadas estables de *Leishmania* con un constructo de interferencia para el CLC LbCLC-A muestran que cuando infectan una línea celular de macrófagos de ratón no sobreviven. El objetivo de este trabajo se enfocó en utilizar un modelo animal para ampliar el conocimiento del proceso de infección, a través de la evaluación de la virulencia de cuatro cepas de parásitos de *Leishmania* infectando ratones de la cepa Balb/c.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	6
2. Planteamiento del problema y justificación del proyecto	7
3. Marco teórico	8
3.1 Epidemiología de la leishmaniasis	7
3.2 Ciclo de vida del parásito	9
3.3 Virulencia y condiciones para el desarrollo de la lesión	9
3.4 Modelos experimentales	11
3.4.1 Modelo parásito	12
3.4.2 Modelos animales	13
4. Objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
5. Materiales y métodos	16
5.1 Infección experimental en ratones cepa Balb/c	16
5.2 Características de las cepas de <i>Leishmania</i>	16
5.3 Valoración de la virulencia	17
5.4 Análisis de los datos	17
6. Resultados	19
6.1 Monitoreo de aparición de lesiones y seguimiento a la infección	19
6.2 Determinación del grado de virulencia	21
6.3 Análisis del tiempo en el que se desarrollaron las lesiones en los ratones	21
6.4 Resultados estudio histopatológico	24
7. Discusión de los resultados	25
8. Conclusiones	27
9. Recomendaciones	27
10. Bibliografía	28

1. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos intracelulares obligados de la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*, que se transmite a los mamíferos por la picadura de las hembras de insectos dípteros de la familia Psychodidae y sus reservorios son diferentes animales silvestres y domésticos. A nivel mundial anualmente se reportan más de 2 millones de nuevos casos y se estima que en las áreas endémicas alrededor de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la infección (Ashford 2000; Herwaldt, 1999; Solbach 2000).

Esta enfermedad constituye un problema importante de salud pública en algunas regiones tropicales y subtropicales. Actualmente no se cuenta con vacunas para prevenirla y el tratamiento está basado en quimioterapia con una serie de medicamentos que generan efectos secundarios por su alta toxicidad y difícil administración, además de los elevados costos (OMS 2014).

Las infecciones pueden ser asintomáticas (Desjeux 2001; Desjeux 2004; Murray *et al.* 2005; Remme *et al.* 2002) o pueden conducir a diferentes síndromes clínicos que involucran órganos internos, piel y/o mucosas (Azulay *et al.* 1995). El amplio rango de las manifestaciones clínicas puede atribuirse a la especie, la variabilidad en la virulencia del parásito (Chang *et al.* 1999; Chang y McGwire 2002; Cunha *et al.* 2013) y a la variabilidad de la respuesta inmune del hospedero (Convit *et al.* 1993; Grimaldi y Tesh 1993; Bañuls *et al.* 2007; Saporito *et al.* 2013; Savoia 2015).

Chang y McGwire (2002) clasificaron los factores de virulencia de *Leishmania* spp., en dos grupos: A) Determinantes de evasión/invasión, los cuales son indispensables para la infección, y B) Determinantes patoantigénicos, que incluye todos los factores de virulencia responsables de inducir una respuesta inmunopatológica que determina las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, también conocidas como fenotipo de virulencia (Chang y McGwire, 2002).

El grupo de investigación de Biofísica y Biología de Membranas de la Universidad Nacional de Colombia, se ha especializado en el estudio de moléculas asociadas

con la regulación iónica de *Leishmania*, debido a su importancia como posibles candidatos para vacunas.

Este trabajo se centró en la infección *in vivo* de ratones de la cepa Balb/c, para estudiar la capacidad de infección de cuatro cepas modificadas de *Leishmania*, a través del seguimiento y evaluación de la aparición y variación de tamaño de lesiones que se desarrollen en este modelo animal.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Las leishmaniasis cutánea y mucocutánea son patologías que provocan lesiones ulcerativas en la piel y en las mucosas, respectivamente y son endémicas de zonas tropicales y subtropicales. Aún no existen vacunas efectivas para prevenir estas enfermedades, que además son prevalentes en áreas rurales, lo cual dificulta el acceso a diagnóstico y tratamiento oportuno en áreas alejadas de los grandes centros urbanos.

Existen consideraciones éticas que restringen la investigación en humanos, por tanto, el uso de modelos animales es de utilidad para hacer seguimiento a la aparición y evolución de infecciones, simulando algunas características clínicas e inmunológicas de la enfermedad en humanos (Handman 2001) y son de gran valor para el diseño de opciones de tratamiento. El grupo de investigación de Biofísica y biología de membranas de la Universidad Nacional de Colombia, estudiando proteínas asociadas con el transporte del ión cloruro (Cl⁻) en la membrana plasmática de formas promastigotes de *L. (V.) braziliensis* pertenecientes a la familia CLC, ha sugerido que podrían estar asociadas con regulación de volumen, diferenciación y supervivencia del parásito (Zapata 2016).

Hasta ahora todos los ensayos han sido efectuados *in vitro* trabajando con líneas celulares de macrófagos de ratón J774.A1 con cepas de *Leishmania* transfectadas establemente por electroporación con constructos de interferencia o sobreexpresión de genes CLC *L. (V) braziliensis*. Los resultados obtenidos a partir de los diferentes estudios empleando las cepas transfectadas estables de *Leishmania* con un

constructo de interferencia para LbCLC-A, han mostrado que cuando infectan una línea celular de macrófagos de ratón el promastigote no se diferencia a amastigote y no sobrevive en el ambiente de la vacuola parasitófora (Zapata 2016).

Entender los mecanismos que se asocian con la regulación de volumen del parásito y si esta a su vez determina la habilidad de *Leishmania* de diferenciarse de promastigote a amastigote es importante, así como estudiar los determinantes de la virulencia del parásito. Este trabajo buscó evaluar el impacto de la interferencia y expresión de LbCLC-A en la virulencia de promastigotes usando un modelo de infección *in vivo*, haciendo seguimiento a la aparición y progreso de lesiones en ratones de la cepa Balb/c inoculadas con cuatro cepas de *Leishmania*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Epidemiología de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad tropical. Constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial y se clasifica como categoría I por el *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* (TDR).

En Colombia, la leishmaniasis es endémica en casi todo el territorio, excepto Bogotá, Tunja, Pasto y San Andrés Islas, concentrándose en 1.079 municipios (INS-Sivigila 2018). La presentación clínica más frecuente y la de mayor distribución geográfica, es la cutánea, representando entre 95% y 98% de los casos. La leishmaniasis mucosa, afecta entre el 1% al 4% de la población y se puede presentar después de semanas o años de la ocurrencia de la lesión cutánea, como resultado de la diseminación del parásito a las mucosas de los vertebrados y la leishmaniasis visceral, tiene una menor incidencia en nuestro país, representando entre el 0,1 y 1,5 %, con el agravante de ocasionar la muerte de los niños en ausencia de tratamiento (INS - SIVIGILA 2019).

3.2 Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida del parásito involucra dos estadios. En el intestino del insecto vector se encuentra en forma de promastigote, forma que exhibe un flagelo que le confiere movilidad y se aloja extracelularmente. A su vez el promastigote se presenta en dos formas diferenciables, procíclica y metacíclica, siendo esta última forma infectiva y se caracteriza por baja tasa de replicación y alta movilidad.

En el hospedero vertebrado, el parásito toma la forma de amastigote, esta forma es ovoide, tiene un flagelo retraído por tanto es inmóvil y se aloja en los macrófagos (Ramírez *et al.* 2013), al contrario de la forma de promastigote, el amastigote se multiplica intracelularmente en la vacuola parasitófora por fisión binaria, donde la tasa de replicación alta (Sacks *et al.* 1984).

3.3 Virulencia y condiciones para el desarrollo de la lesión

La virulencia o grado de patogenicidad, es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un hospedero susceptible y se manifiesta como un espectro de manifestaciones clínicas (Chang *et al.* 1990). La virulencia es una consecuencia del proceso de adaptación del parásito al hospedero que le permite desarrollar la infección y comprende el trabajo coordinado de determinantes moleculares denominados factores de virulencia, los cuales influyen al agente infeccioso a desarrollar una patología en el hospedero.

Chang y McGwire clasificaron los factores de virulencia presentes en *Leishmania spp.*, en dos grupos, el primero agrupa determinantes de evasión/invasión y el segundo, determinantes patoantigénicos. Los determinantes de evasión/invasión son aquellos involucrados en los mecanismos del parásito necesarios para establecer la infección, tales como: unión de *Leishmania* al macrófago, entrada del parásito al macrófago, sobrevivencia en el interior del macrófago y diferenciación y multiplicación intracelular de los amastigotes (Chang *et al.* 2002).

Leishmania logra infectar exitosamente los macrófagos porque el parásito tiene la capacidad de evadir los mecanismos fisiológicos y moleculares del hospedero vertebrado que representan una barrera en el proceso infeccioso (Shaw 1997). La

vía a través de la cual *Leishmania* entra en el macrófago se denomina fagocitosis mediada por receptores, como los que se encuentran cubriendo la superficie de los promastigotes como lo es el glicocalix, el cual está compuesto por proteínas de anclaje a licofosfatidilinositol (GPI) y glicolípidos en general, entre los que se encuentran el lipofosfoglicano.

Se ha demostrado que el lipofosfoglicano juega un papel fundamental en la infección de los macrófagos (McConville *et al.* 2007), aunque el resto de los componentes también han demostrado influir en la virulencia de los promastigotes sobre las células hospederas, su papel consiste en ayudar la adhesión de los parásitos a la membrana plasmática del macrófago (Naderer y McConville 2008). Sin embargo, existe otro mecanismo mediante el cual el parásito llega al interior del macrófago, este consiste en la fagocitosis de neutrófilos que previamente habían fagocitado a los promastigotes (van Zandbergen 2006).

Leishmania presenta alrededor de 5×10^6 copias de lipofosfoglicanos por célula (LPG), siendo la molécula más abundante el GPI, la cual está anclada a la superficie celular de los promastigotes. Los promastigotes se unen a lectinas presentes sobre el epitelio del intestino de los insectos vectores a través de los LPG, por lo cual, estas moléculas son esenciales para el establecimiento de la infección en los flebótomos (Sacks *et al.* 2000). Sin embargo, se han encontrado otras funciones importantes asociadas al lipofosfoglicano.

Al igual que la GP63, estas moléculas le confieren a los promastigotes metacíclicos resistencia al complemento (Grimm y Jenni 1993). Una vez fagocitados, los LPGs previenen la fusión fagosoma-endosoma, a través de la ruptura de acumulaciones lipídicas en la membrana plasmática que median dicho proceso (Dermine *et al.* 2005). *Leishmania* en estado intracelular amastigote expresa muy pocas cantidades de LPG en su superficie, pero, en lugar de ello, expresan grandes cantidades de licofosfatidilinositol. Así, las propiedades protectoras de los LPG son limitadas a estados iniciales de la infección en hospederos mamíferos, aunque sí son esenciales durante el ciclo de vida en el insecto vector (Spath *et al.* 2003).

Para que determinados genes sean considerados factores de virulencia, sus productos de expresión deben comprobarse experimentalmente y estar involucrados

en el desarrollo de la enfermedad, pero, no deben ser esenciales para la viabilidad del parásito *per se*. Los factores de virulencia deben: 1) aumentar el *fitness* del patógeno y la tolerancia al estrés, 2) ayudar a la invasión de células del hospedero y, 3) modular la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Chang y McGwire 2002; Bifeld y Clos 2015).

De otra parte, los determinantes patoantigénicos son un grupo que incluye todos los factores de virulencia descritos como capaces de inducir una respuesta inmunopatológica como principal causa de los síntomas clínicos. Así, estos determinantes producen anticuerpos con títulos altos en comparación con los anticuerpos producidos por los determinantes de evasión/invasión. Además, son conservados en estructura o son proteínas citoplasmáticas solubles, las cuales a menudo forman parte de otras moléculas o forman partículas subcelulares. Estos incluyen componentes del citoesqueleto (ej: quinesina y tubulinas), proteínas chaperonas (ej: HSP60, HSP70, HSP83, HSP100, STI 1), componentes del ribosoma (ej: el F, PO, P2a), componentes del nucleosoma (ej: H2A/B, H3, H4), componentes del glicosoma, entre otros (Chang y McGwire 2002).

Además del estudio de los determinantes de la virulencia del parásito, es muy importante ampliar el estudio en modelos experimentales mejorados, para entender los mecanismos de infección y la respuesta de las células blanco, con el fin de identificar posibles objetivos para evaluar vacunas candidatas.

3.4 Modelos experimentales

El uso de los animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas aporta a la comprensión sobre la prevención y tratamiento de las enfermedades transmisibles y no transmisibles. Son usados como modelos para investigar y comprender los mecanismos moleculares y celulares y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles (Alfonso 1993; Aguilar-Torrentera 2001).

3.4.1 Modelo parásito

Los estudios desarrollados por el grupo de investigación de Biofísica y biología de membranas de la Universidad Nacional de Colombia, se han enfocado principalmente en el estudio de proteínas asociadas con el transporte del ión cloruro (Cl⁻) en la membrana plasmática de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* pertenecientes a la familia CLC. A través de búsquedas y alineaciones bioinformáticas se identificaron secuencias para los genes *LbCIC-A*, *LbCIC-B*, *LbCIC-C* y *LbCIC-D*.

Se clonaron los genes de esta familia, para generar interferencia y sobreexpresión, y se ligaron en vectores para modular la expresión de estas proteínas, con el fin de estudiar su función. Resultados previos del grupo, han evidenciado el papel que proteínas de la familia CLC de *Leishmania* desempeñan en procesos de regulación de volumen y supervivencia (Lozano *et al.*, 2009; Zapata 2016; García 2016).

Como resultado de estos trabajos se generó una cepa de *Leishmania* transfectada con un plásmido que contiene la secuencia para generar interferencia en la expresión del gen *LbCIC-A* o su sobreexpresión. Se generaron cepas modificadas de *Leishmania* con estos constructos, y, se evaluaron, su morfología, capacidad de infección y crecimiento *in vitro*, así como su capacidad infectiva en una línea celular con comportamiento macrofágico J774A.1, logrando evidenciar disminución en la tasa de crecimiento de los parásitos, cambios morfológicos e incapacidad de diferenciarse de promastigote a amastigote (Zapata 2016).

Estos estudios permitieron postular este grupo de proteínas como blanco terapéutico potencial. Es por esta razón que este trabajo se enfoca en utilizar un modelo animal para evaluar los procesos de infección en un modelo *in vivo*, con estos parásitos modificados.

3.4.2 Modelos animales

El uso de modelos experimentales *in vivo* permite simular las características clínicas e inmunológicas encontradas en una enfermedad humana (Handman 2001). La mayor parte de lo que conocemos actualmente sobre la inmunología y fisiopatología de la leishmaniasis, se debe a los resultados obtenidos mediante el uso de modelos animales experimentales con ratones, hámsteres, perros domésticos y primates no humanos (Oliveira *et al.* 2004).

Durante las últimas cuatro décadas, los modelos murinos se han empleado como modelo en investigación biomédica, debido a que son capaces de reflejar rasgos clínicos e histopatológicos similares a los que se producen en la infección humana. Con ayuda de este modelo se ha ampliado el conocimiento de las rutas de infección, mecanismos celulares y vías de infección de los parásitos hasta alcanzar los órganos internos (McCall *et al.* 2013).

También han sido empleados para conocer el rol que juegan las citoquinas, las cascadas de transducción de señales y medicamentos antileishmaniasicos, los mecanismos efectores necesarios para el control de los parásitos, información necesaria para reconocer la resolución clínica de la enfermedad, la resistencia a una infección secundaria, el control de parásitos y el desarrollo de vacunas (Bogdan y Röllinghoff 1998; Moura *et al.* 2005).

La elección del ratón como modelo biológico cuenta con varias ventajas, la primera de ellas es la sencillez de los métodos de crianza y fácil reproducción (Guénet 2003). La existencia de una gran colección de cepas puras que representan una población inmortal de clones genéticos, por el repetido apareamiento entre hermano-hermana, lo que los convierte en organismos genéticamente idénticos, permitiendo una caracterización de fenotipo de una profundidad que rara vez se logra en otros sistemas mamíferos (Loria-Cervera 2014).

De otra parte, la existencia de un conjunto definido de diferencias genéticas entre las cepas consanguíneas permite explorar el efecto de la diversidad genética en casi cualquier fenotipo de interés (Szatkiewicz *et al.* 2008).

El presente trabajo busca evaluar la capacidad infectiva de cuatro cepas de *Leishmania* mediante un ensayo piloto de infección *in vivo* en ratones de la cepa Balb/c

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad infectiva de cuatro cepas de *Leishmania* mediante un ensayo piloto de infección *in vivo* en ratones de la cepa Balb/c.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estructurar un diseño experimental que permita determinar diferencias en la capacidad infectiva de cuatro cepas de *Leishmania* en ratones de la cepa Balb/c.
- Determinar el grado de virulencia de las cepas de *Leishmania*: WT (Wild type), pSP (transfectadas con el vector), E1 (transfectada con un constructo de interferencia) y FULL (transfectada con el gen *LbCLC-A*) en ratones de la cepa Balb/c.
- Evaluar la aparición y progreso de lesiones en ratones Balb/c infectados con cuatro cepas diferentes de *Leishmania*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Infección experimental en ratones cepa Balb/c

Se realizó un estudio de tipo experimental, en el área de animales de laboratorio en el Bioterio de Barrera - ABSL-2/BSL-2 del Instituto Nacional de Salud, empleando ratones de la cepa Balb/c. A los roedores se les administró agua y alimento *ad libitum* y fueron observados durante catorce (14) semanas post-inoculación, haciendo seguimiento diario para identificar tiempo de aparición de las lesiones y registro de los cambios físicos.

Se emplearon 16 ratones de la cepa Balb/c de 21 días de nacidos, los cuales fueron infectados experimentalmente vía subcutánea en la nariz con 0,1 mL de una concentración de 3×10^5 parásitos/mL. Como grupo control se tomaron 2 ratones inoculados con solución salina. Para la infección experimental se emplearon cuatro cepas de parásitos, tres de las cuales están modificadas genéticamente para expresar de manera diferencial la proteína BbCIC-A.

5.2 Características de las cepas de *Leishmania*

1. Cepa WT (Wild type) de *Leishmania*, del cepario del Laboratorio de Biofísica y biología de membranas, adquiridos del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), tipificados por anticuerpos monoclonales y mapa de restricción (Ortegón 2018), se cultivaron a 26 ± 1 °C en medio RPMI-1640 (Life technologies™) suplementado con 5 - 10% de suero fetal bovino (SFB, Ref: S1810, BOWEST, Kansas City, MO) inactivado con calor (56 °C).

Con base en esa cepa se crearon por transfección las siguientes cepas:

2. Cepa pSP: cepa de *Leishmania* transfectada con el plásmido de expresión: *psp72RaNeoaGFP*, donado por el grupo de Elizabeth Ullu (Atayde *et al.* 2012).
3. Cepa LbE1: *Leishmania* con el constructo de interferencia: *pSP72RaneoaGFP+ iLbCLC-A*, desarrollada por Angela Cristina Zapata Lesmes y Marcela Camacho.

4. Cepa LbFULL: *Leishmania* con el constructo de sobreexpresión: *pSP72RaneoaGFP+ fullLbCLC-A* desarrollado por Viviana Ortegón y Marcela Camacho.

5.3 Valoración de la virulencia

La evolución de las lesiones se evaluó desde el primer día de infección, hasta catorce (14) semanas después. Durante cada observación se registraron el tiempo de aparición y evolución de las lesiones en el pabellón de la oreja de los ratones inoculados, la forma y tamaño de las úlceras, el peso de cada ratón. Se tomó registro fotográfico de los cambios observados.

Se hizo seguimiento clínico de cada lesión, para lo cual se empleó una escala basada en la asignación de cruces (0–4) para definir la gravedad de la lesión, según criterios estandarizados por el Grupo de Inmunomodulación de la Universidad de Antioquía:

0, ausencia de lesión o inflamación (oreja normal).

1 +, inflamación y nódulos pequeños no ulcerados.

2 ++, nódulos que comienzan a ser ulcerados o nódulos grandes sin úlcera.

3 +++, nódulos con úlceras activas con o sin costra.

4 +++, lesiones con úlceras grandes activas y abiertas, y lesiones con costra necrótica.

Se midió el tamaño de la lesión con calibrador Vernier y se estimó el área de lesión por mm². Al final de la prueba se sacrificaron los animales y se realizaron biopsias de ganglios, hígado y bazo para determinar la presencia de formas parasitarias en los tejidos.

5.4 Análisis de los datos

Se hizo un análisis descriptivo de la variable tiempo de aparición de la lesión, se realizaron análisis estadísticos para determinar la probabilidad de supervivencia de

los ratones durante el tiempo que duró el estudio y se analizó y comparó el peso de los ratones infectados y el grupo control. El análisis estadístico se hizo empleando la metodología de modelos de regresión generalizados para datos longitudinales, análisis de supervivencia de los ratones y análisis descriptivo del tiempo de aparición de cierto evento.

Para analizar la relación entre la respuesta Y y las covariables X_1, X_2, X_p se tiene el siguiente modelo: $Y_{ij} = (\alpha + u_{0i}) + (\beta + u_{1i}) X_{ij} + \epsilon_{ij}$

Donde:

u_{0i} intercepto aleatorio del individuo i

u_{1i} pendiente aleatoria del individuo i

6. RESULTADOS

El seguimiento a la infección de los ratones se extendió durante 14 semanas (98 días). Diariamente se hizo seguimiento a la aparición y evolución de lesiones, el registro del peso se hizo cada 8 días (para un total de 16 registros), ver tablas 1 y 2.

6.1 Monitoreo de aparición de lesiones y seguimiento a la infección

Durante el desarrollo de la prueba se encontró que la cepa pSP fue la única que provocó la aparición de lesiones en las orejas de los ratones, los ratones infectados con las cepas FULL, E1 y Wild Type no se desarrollaron lesiones (ver tabla 1).

Tabla 1. Seguimiento de los ratones Balb/c inoculados con cuatro cepas de *Leishmania* durante 14 semanas post-inoculación

CEPA	RATÓN	TIEMPO DE APARICIÓN DE LESIÓN	EVOLUCIÓN DE LESIONES A TRAVÉS DE LAS 14 SEMANAS DE OBSERVACIÓN
pSP	1,2,3,4	Con lesiones	Los cuatro ratones desarrollaron lesiones en las orejas
FULL	1,2,3,4	Sin lesiones	Los ratones no desarrollaron lesiones, sobrevivieron hasta el final de la prueba.
E1	1,2,3	Sin lesiones	Los ratones no desarrollaron lesiones, sobrevivieron hasta el final de la prueba.
WT	1,2,3	Sin lesiones	Los ratones no desarrollaron lesiones, sobrevivieron hasta el final de la prueba.
Control	1,2		Los controles sobrevivieron hasta el final de la prueba.

Respecto a la evolución de las lesiones provocadas en los ratones por la cepa pSP, en las primeras 4 semanas no se presentaron cambios, a partir de la quinta semana (día 22) se registró el enrojecimiento de las narices de los ratones infectados con la cepa pSP. En la semana 6 en el día 22 apareció la primera pápula en uno de los cuatro ratones, al finalizar la semana 6 (día 25), todos los ratones (4) presentaron pápulas en las orejas, estas alcanzaron un tamaño de 0,22 mm².

Las pápulas se ubicaron en diferentes áreas de las orejas en cada ratón, en el centro (ratones 1 y 4), cerca al borde superior (ratón 2) y en la base de la oreja

(ratón 3). Los ratones infectados con la cepa pSP murieron entre los 32 y 59 días post infección.

En la semana 6 (día 39), en los ratones 1 y 2 la pápula se transformó en un orificio, el tamaño de este fue de 0,22 mm igual que la pápula. El día 32 el ratón número 4 desarrolló una lesión que se extendió hasta 7 mm² en la parte central de la oreja (ver tabla 2).

Tabla 2. Seguimiento de los ratones Balb/c inoculados con la cepa pSP durante 14 semanas post-inoculación

CEPA	RATÓN	TIEMPO DE APARICIÓN LESIÓN	EVOLUCION DE LAS LESIONES A TRAVÉS DE LAS 14 SEMANAS DE OBSERVACIÓN		
pSP	1	Día 22: enrojecimiento nariz. Día 25: aparición de pápula 0.22 mm ² en área centro de la oreja. Día 39: pápula se transforma en orificio, conserva el mismo tamaño. Día 46: muere.			
pSP	2	Día 22: aparición de pápula 0.22 mm ² en borde externo de la oreja. Día 24: enrojecimiento nariz. Día 40: sin cambios pápula 0.22 mm ² . Día 43: muere.			
pSP	3	Día 23: aparición de pápula 0.22 mm ² en base de la oreja junto al pabellón auricular. Día 24: enrojecimiento nariz. Día 39: pápula se transforma en orificio, conserva el mismo tamaño. Día 52: muere.			
pSP	4	Día 22: enrojecimiento nariz. Día 23: aparición de pápula 0.22 mm ² en el centro de la oreja. Día 32: pápula se extendió alcanzó 7 mm ² . Día 39: muere.			

La medición del área de lesión en la oreja de los dos ratones en los que se desarrolló un orificio, no tuvo variaciones, por esta razón no se pudo medir la escala de gravedad de la lesión ya que una vez apareció el orificio de tamaño 0,22 mm² no evolucionó con el tiempo, permaneció igual hasta el final de la prueba.

6.2 Determinación del grado de virulencia:

En la tabla 3 se presentan los resultados de la determinación del grado de virulencia de las cuatro cepas de *Leishmania* empleadas en el estudio, determinado por la escala de gravedad de la lesión provocada en los ratones y el tamaño de la misma.

Tabla 3. Grado de virulencia de las 4 cepas de *Leishmania* provocadas por infección experimental en ratones de la cepa Balb/c

Cepa	Escala de gravedad de la lesión	Tamaño de lesión (μm^2)	Virulencia (Resultado)
pSP	+	0,22 – 7	Menor
Full	0	0	Nula
E1	0	0	Nula
WT	0	0	Nula

6.3 Análisis del tiempo en el que se desarrollaron lesiones en los ratones

Se realizaron análisis para determinar la probabilidad de supervivencia, la aparición de lesiones en los ratones infectados con 4 cepas de *Leishmania* y se analizó y comparó el peso de los ratones.

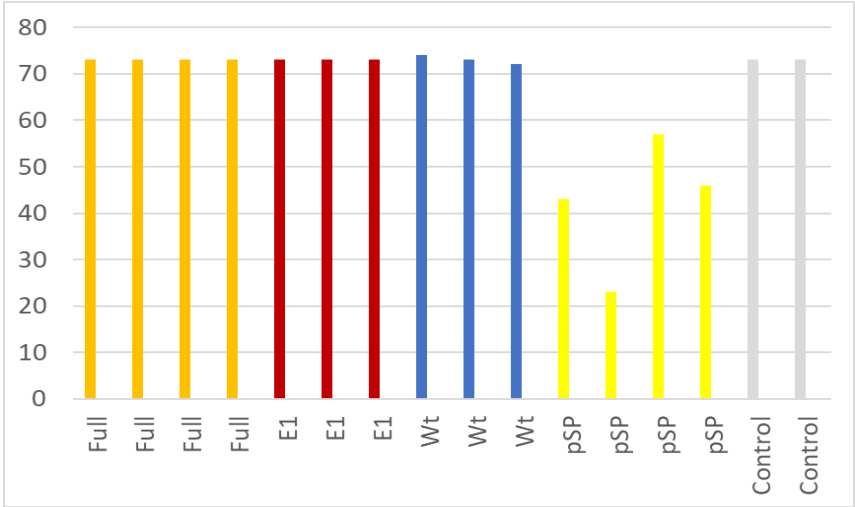
El análisis de los datos permitió identificar que la muerte de los ratones se relacionó con la inoculación e infección con la cepa pSP. La mediana del tiempo de supervivencia para todos los grupos fue de 73 días, excepto para los ratones inoculados con la cepa pSP cuya supervivencia fue de 44,5 días en promedio (ver tabla 4).

Tabla 4: Tiempo de supervivencia de los ratones

Identificación del ratón	CEPA Leishmania	SEXO	TIEMPO	ESTADO FINAL
1	Full	macho	73	Vivo
2	Full	macho	73	Vivo
3	Full	macho	73	Vivo
4	Full	macho	73	Vivo
5	E1	macho	73	Vivo
6	E1	macho	73	Vivo
7	E1	macho	73	Vivo
8	Wt	macho	74	Vivo
9	Wt	macho	73	Vivo
10	Wt	macho	72	Vivo
11	pSP	hembra	46	Muerto
12	pSP	hembra	43	Muerto
13	pSP	hembra	52	Muerto
14	pSP	hembra	39	Muerto
15	Control	macho	73	Vivo
16	Control	macho	73	Vivo

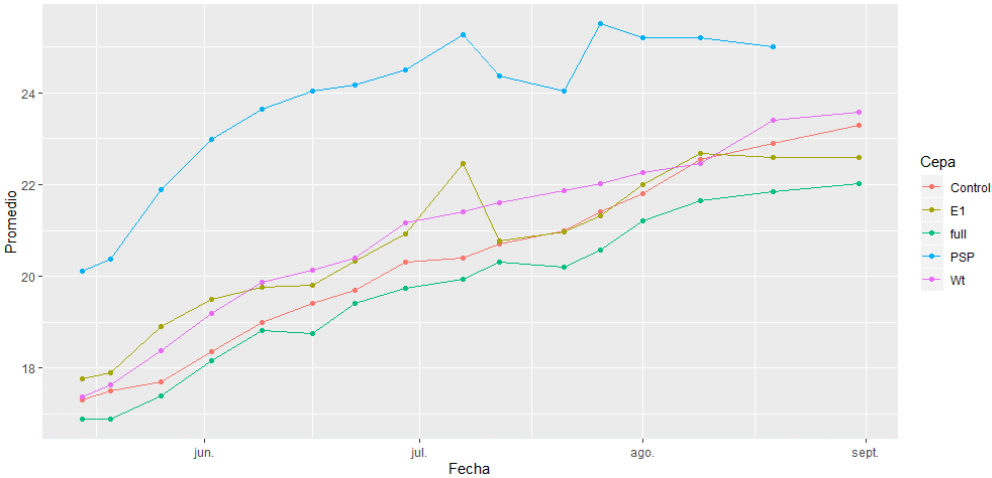
En la figura 1 se observa que los ratones infectados con la cepa pSP murieron antes del día 52 (en promedio en el día 42), los ratones infectados con las otras cepas sobrepasaron los 60 días. En la figura 1, se observa la probabilidad de supervivencia para las infecciones con cada cepa.

Figura 1. Tiempo de supervivencia de los ratones Balb/c infectados con las cuatro cepas vs la cepa control



Se hicieron 14 mediciones del peso para cada ratón. En la figura 2 se muestran los promedios de peso a través del tiempo, al hacer el análisis se observa un comportamiento de crecimiento lineal.

Figura 2: Promedio del peso en el tiempo



Se hizo un análisis de los valores estimados de los parámetros fijos del modelo, aplicando la metodología establecida en Correa Morales y Salazar Uribe (2016) y se obtuvo el siguiente vector de estimadores de $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$ junto con sus errores estándar y pruebas de significancia (ver tabla 5).

Tabla 5. Valores estimados de los parámetros fijos del modelo

Parámetro	Símbolo	Estimador	Error estándar	GL	Valor <i>t</i>	Valor <i>p</i>
Intercepto	$\hat{\beta}_0$	17,4124262 3	0,761137268	15,80460764	22,87685409	1,54075E-13
Días	$\hat{\beta}_1$	0,05129244 3	0,002490674	11,38404158	20,59380383	2,29351E-10
Cepa E1	$\hat{\beta}_2$	0,95840112 2	0,982455995	15,81732387	0,975515572	0,343988943
Cepa full	$\hat{\beta}_3$	- 0,27569931 1	0,932039594	15,81732388	-0,295802145	0,771229244
Cepa PSP	$\hat{\beta}_4$	4,03288732 4	0,934096188	15,99670786	4,317421884	0,000531265
Cepa Wt	$\hat{\beta}_5$	0,63568160 0	0,982455995	15,81732387	0,647033153	0,526889700

El valor estimado de 0,051 del parámetro días corresponde al peso promedio que aumentan los ratones por día. No se encontraron diferencias significativas en el peso de los ratones, el crecimiento fue lineal, a mayor número de días, mayor peso. El valor estimado de 4,032 corresponde a la diferencia promedio entre el peso de los ratones de la cepa pSP y el control, este valor fue positivo porque el peso de los ratones infectados con la cepa pSP siempre estuvo por encima del peso del control.

6.4 Resultados estudio histopatológico

Los resultados del estudio histopatológico practicado por el patólogo del Instituto Nacional de Salud, analizando ganglios, orejas, hígado y bazo fueron negativos, no se encontraron formas parasitarias.

7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este estudio, fueron controlados los parámetros de inoculación experimental en todos los ratones. Se usó la cepa de ratón Balb/c, la cual es considerada una cepa susceptible de infectarse y desarrollar lesiones (Kurey et al. 2009) y se inoculó una cantidad constante de 1×10^5 promastigotes de cada cepa a cada ratón, de acuerdo con el diseño experimental. La inoculación se efectuó en la nariz. Este sitio ha sido previamente reportado como capaz de generar una respuesta inmune TH2 o de resolución de la lesión en infecciones con *L. major* (Baldwin et al. 2003).

En la leishmaniasis, los macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígenos que activan los linfocitos T quienes contribuyen en la eliminación del parásito. Los linfocitos T activados inducen la producción de citocinas que participan en la resolución o exacerbación de la leishmaniasis, en el modelo murino, se ha reportado observa una clara dicotomía en la respuesta inmune asociada con el desarrollo de la lesión que corresponde a la respuesta Th2, o a la resolución de las lesiones a cargo de la respuesta Th1. La enfermedad es el resultado de la interacción de diferentes factores como la especie y la virulencia de la *Leishmania* junto con la respuesta inmune del hospedero, determinando si la infección se presenta o no (Lenis 1998).

La cepa pSP fue la única que provocó lesiones en los ratones infectados. Al analizar los pesos de los ratones, no se encontró relación entre la infección y el cambio en el peso de los ratones, dado que se evidenció que el peso aumentó gradualmente en todos los ratones a medida que transcurría el tiempo después de la infección con las cepas de *Leishmania*.

La estimación de la virulencia de las cepas, basados en la estimación de la escala de gravedad de la lesión y la medición del tamaño de la lesión permitió identificar que la cepa pSP, fue la única virulenta, con una escala de gravedad menor, dado el promedio de área de lesión menor a 5 mm^2 . Las otras cepas no fueron virulentas, la escala de gravedad de lesión fue de 0.

De acuerdo con los resultados obtenidos las infecciones causadas por la cepa pSP, estarían vinculando a este plásmido de expresión con la activación de procesos de

virulencia para *Leishmania*, y de mayor resistencia a la respuesta inmunológica del ratón, en relación con lo observado para las infecciones con las otras cepas, en las cuales no se generó ninguna lesión. Lo anterior, significa que tanto la cepa silvestre (WT), como las cepas que tiene los constructos de interferencia (E1) y sobreexpresión (Full) del gen *CLC-A*, pueden ser controladas al interior de los macrófagos murinos por el sistema inmunológico del ratón.

El constructo presente en la cepa E1, tiene como objetivo silenciar la expresión de la proteína CIC-A, la cual, de acuerdo con lo reportado por Zapata y colaboradores en 2016, interfiere con la sobrevivencia del parásito al interior de la célula macrofágica, en experimentos *in vitro*.

De otra parte, el constructo Full, generaría una sobreexpresión de dicha proteína, sin embargo, se ha reportado que, en algunos sistemas de expresión de proteínas, el exceso de proteína segregada en la célula, induce una respuesta celular para inhibir los procesos de expresión (Zapata *et al.* 2016), lo que podría estar interfiriendo con la expresión de CIC-A y, por tanto, afectando la supervivencia del parásito dentro de las células de defensa del ratón.

Es importante considerar que la virulencia provocada por los parásitos que causan leishmaniasis no es solo el resultado de características genotípicas de las cepas, sino que también es el resultado de la respuesta del hospedero vertebrado (Loeuillet *et al.* 2016; Bañuls *et al.* 2007; Handman *et al.* 2005). Algunos autores refieren que la mayor o menor infección con parásitos del género *Leishmania* puede ser modulada por diversos factores, ambientales y genéticos, así como por su hospedador vertebrado (Blackwell 1996) y por los vectores (Titus, Ribeiro 1988).

Es relevante continuar estudiando el papel de las proteínas CLC en *Leishmania*, ampliar el conocimiento de su papel como facilitadoras de la entrada de glucosa y aminoácidos, y su papel como transportadores de cloruro que pueden estar asociadas a la respuesta del parásito y pueden ser empleadas como blanco terapéutico potencial.

Estos resultados son importantes para futuros estudios que busquen entender las diferencias en respuesta inmune, la interacción *Leishmania*-hospedero, el desarrollo

de nuevos fármacos y el estudio de los mecanismos moleculares que desencadenen fenómenos de resistencia a medicamentos anti-Leishmania. Se cumplieron con los objetivos planteados y se espera que el trabajo sea la base de futuros análisis que complementen los resultados aquí obtenidos.

8. CONCLUSIONES

- La cepa pSP fue la única virulenta y generó lesiones en los ratones.
- El promedio del tiempo de aparición de las lesiones en los ratones infectados con la cepa pSP fue de 23,2 días.
- No se observaron diferencias significativas en el peso de los ratones infectados con las cuatro diferentes cepas.
- El tiempo de sobrevivencia de los ratones infectados con la cepa pSP fue menor.
- Los ratones infectados con las cepas de Leishmania WT, E1 y Full, tuvieron una respuesta inmunitaria de control de la infección, similar a la de los ratones control. Lo anterior puede significar que la alteración en la expresión de la proteína CIC-A, disminuye la capacidad de virulencia del parásito.
- El estudio de proteínas con potencial como blanco terapéutico permitirá a futuro contar con opciones para el control de la leishmaniasis.

9. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios se recomienda aumentar el número de réplicas para el estudio y se recomienda distribuir aleatoriamente el número de ratones de acuerdo con el género ya que solo en la cepa pSP habían ratones hembras y este también pudo haber sido un factor que influyó en los resultados. El uso de modelos animales experimentales es una buena alternativa para valorar la respuesta celular inmune en la leishmaniasis cutánea.

10. BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Torrentera F, Carlier Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major* infection. *Rev Latinoam Microbiol.* 2001;43:135-42.

Alfonso LC y Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 1993; 61:2952-9.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671

Ashford, R. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269-1281. 2000. PMID:11113254 [Indexed for MEDLINE]

Atayde VD, Ullu E, Kolev NG. A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stemloop RNA. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;184(1):55-58. Doi:10.1016/j.molbiopara.2012.04.003

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64: 1-109.

Bifeld E, Clos J. 2015. The genetics of *Leishmania* virulence. *Med Microbiol Immunol* (6):619-34. doi: 10.1007/s00430-015-0422-1.

Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* 1998;28:121-34.

Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444-448.

Cunha J, Carrillo E, Sánchez C, Cruz I, Moreno J, Cordeiro-da-Silva A. 2013. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral Leishmaniasis. *Parasit Vectors* 6: 122.

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol*, 44:499-529.

Chang KP, Akman L, Nielsen JS. 1999. *Leishmania* virulence and genetic heterogeneity. *Clinics in Dermatology* 17, 269–273.

Chang KP, McGwire BS. 2002. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis* 1: 1.

Loría-Cervera, Elsy Nalleli, y Andrade-Narváez, Fernando José. (2014). Modelos animales para el estudio de la inmunología de la leishmaniasis. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56 (1), 1-11. <https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>

García Otálora, M.A., Caracterización funcional de un canal de cloruro CLC de *Leishmania*, 2016, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. 27. Lozano

Grimaldi G, Tesh RB. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-250.

Guénet JL, Bonhomme F. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet*. 2003; 19:24-31.

Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14:229-43.

Herwaldt, B. Leishmaniasis. *Lancet*. 354: 1191-1199. 1999. *Lancet*. 1999 Oct 2;354(9185):1191-9.

Jiménez, Y.Y., Estudio de un canal de cloruro de *Leishmania* y su importancia en la fisiología del parásito, 2012, Universidad Nacional de Colombia.

Lenis AM. La respuesta celular inmune en la Leishmania-sis cutánea americana. Biomédica 1998; 18: 274-284.

Loria-Cervera, Elsy Nalleli y Andrade-Narvaez, Fernando José. 2014. Modelos animales para el estudio de la inmunología de leishmaniasis. Rev. Inst Med Trop. S. Paulo. 56:1 [PubMed]

McCall, L.I.; Zhang, W.W. & Matlashewski, G. 2013. Determinants for the development of visceral Leishmaniasis disease. PLoS pathogens, 9:1-7. e1003053.

McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. Trends Parasitol. 2007 Aug;23(8):368-75.

Marsden PD. 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 27:93-101 [PubMed]

Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Infect Immun. 2005;73:5827-34.

Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol. 2008 Feb;10(2):301-8.

Neuber H. Leishmaniasis. JDDG. 2008. 9: p. 754-765.

Oliveira, C.; Jania, M.; Gomez, R.; Barral, A. & Brodskyn, C. 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. Drug Discovery Today, 1: 81-86.

Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis [En línea]. - Enero de 2014. - Mayo de 2014. - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>.

Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas, 2016, OPS Washington DD.

Quesada Cortés A, Campos Muñoz L, Rubio Flores C, Martín Díaz MA, Navarro Sánchez M, Regojo Zapata RM, Lucas de Laguna R, Herranz Pinto P. 2005. Leishmaniasis cutánea: revisión y avances terapéuticos. *Dermatología Práctica*. 13(5):11-22.

Ramírez, C.A., J.M. Requena, and C.J. Puerta, Alpha tubulin genes from *Leishmania braziliensis*: genomic organization, gene structure and insights on their expression. *BMC genomics*, 2013. 14(1): p. 454.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.

Remme JHF, Blas E, Chistulo L, Desjeux PM, Engers HD, Kanyok TP, *et al.* Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Parasitol*. 2002;18:421-6.

Ridley, D., & Ridley, M. 1983. The evolution of the lesion in cutaneous Leishmaniasis. *Journal Pathology*, 141, 83-96.

Sacks, D.L. and P.V. Perkins, Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 1984. 223(4643): p. 1417-9.

Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley SM. 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania* sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(1):406–411.

Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. 2013. Visceral Leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis* 17: e572-576.

Savoia D. 2015. Recent updates and perspectives on Leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 9: 588-596.

Schriefer A, *et al.* 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect. Immun.* 72:508–514.

Shaw, J. 1997. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Brazilian Journal of Genetics* 20, 123–128.

Sivigila. 2018. Instituto Nacional de Salud. Sivigila. Ministerio de la Protección Social. Informe del evento Leishmaniasis, años 2010 a 2018. Available at: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=1729>.

Solbach, W.; LASKAY, T. The Host Response to Leishmania Infection. *Adv. Immunol.* 74: 275-317. 2000.

Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(16):9536–9541. doi:10.1073/pnas.1530604100

Szatkiewicz JP, Beane GL, Ding Y, Hutchins L, Pardo-Manuel de Villena F, Churchill GA. An imputed genotype resource for the laboratory mouse. *Mamm Genome.* 2008;19:199-208.

van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 12;103(37):13837-42.

Zapata Lesmes, A.C., Impacto del silenciamiento de la expresión de un transportador de la familia CLC sobre el ciclo de vida *in vitro* de parásitos del género *Leishmania*, 2015, PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, FACULTAD DE CIENCIAS.