

# INFLUENCIA DEL SEXO EN LA INFECCIÓN DE RATONES C57BL/6 INOCULADOS CON *Leishmania mexicana* CEPA AZV

## The Influence of Sex in the Infection of Mice C57BL/6 inoculated with *Leishmania mexicana* Strain AZV

Jesús Maldonado<sup>1</sup>, Marina Calcagno<sup>2</sup> y Luisana Avilán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Decanato de Ciencias Veterinarias, Núcleo "Héctor Ochoa Zuleta", Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apartado 400. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. E-mail: jesusmaldonado@ucla.edu.ve

### RESUMEN

En este trabajo se estudió la influencia del sexo en el desarrollo de la leishmaniasis experimental, al observar la evolución clínica de la lesión y el patrón inmunohistopatológico en ratones consanguíneos C57BL/6 infectados con parásitos de la cepa AZV de *Leishmania mexicana*. El estudio mostró divergencias en el curso de la patología entre ambos sexos. Se registraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la evolución del tamaño de la lesión; en los machos se observó disminución notable del tamaño de la lesión a partir de la novena semana de estudio, mientras que en las hembras se registró aumento progresivo del tamaño de la lesión, hasta alcanzar el final del ensayo. Para la semana 13 las hembras en promedio tenían una lesión tres veces mayor que la registrada en los machos. Se observaron diferencias en los patrones histopatológicos de las muestras de piel de los ratones machos y hembras, en las últimas la extensión de la inmunoreactividad con el Ac  $\alpha$ -*Leishmania* fue mayor. En todas las muestras de ganglio linfático del miembro infectado, independientemente del sexo, se evidenció la presencia del parásito por inmunoreactividad con el Ac  $\alpha$ -*Leishmania*; pero no se detectó la presencia de amastigotes en: ganglio linfático del miembro no infectado, hígado o bazo en ninguno de los animales estudiados al usar la misma técnica. En conjunto los resultados indican que bajo las condiciones experimentales utilizadas, el sexo de los ratones influye en el desarrollo de la leishmaniasis experimental.

**Palabras clave:** *Leishmania mexicana*, leishmaniasis, ratones C57BL/6, sexo.

### ABSTRACT

The influence of the sex was studied on the development of pathological alterations during experimental leishmaniasis, by observing the clinical evolution of the leg lesions and the immunohistopathological pattern in the skin, lymph node, liver and spleen of inbred mice C57BL/6 infected with the strain AZV of *Leishmania mexicana*. A divergence in the evolution of the lesion size was evident: In male specimens, there was a distinctive reduction, beginning in the ninth week of the study, whereas in females a progressive increase of the lesion was registered throughout the experiment up to the 13<sup>th</sup> week. The average size of the lesion was three times greater in females than in males. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in the course of the lesion were observed. Differences in the histopathological patterns of skin samples of male and female mice were also observed. In females, the extension of the immunoreactivity with the antibodies anti-  $\alpha$ -*Leishmania* (*Ab*- $\alpha$ -*Leishmania*) was greater. In all lymph node samples of the infected limb, regardless of sex, the presence of the parasite was detected via immunoreactivity with *Ab*  $\alpha$ -*Leishmania*; however, the same technique yielded no evidence of the presence of the parasite in non-infected limbs, liver or spleen on any one of the specimens studied. Summing up, the results indicate that under the used experimental conditions, sex influences in the development of experimental leishmaniasis in mice.

**Key words:** *Leishmania mexicana*, leishmaniasis, mice C57BL/6, sex.

### INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria, causada por especies del género *Leishmania*, que se distribuye ampliamente en el mundo y constituye un serio problema de sa-

lud pública en algunas regiones tropicales y sub-tropicales. En las áreas endémicas habitan aproximadamente unos 350 millones de personas con riesgo de infección y a nivel mundial se estima que anualmente se presentan más de 2 millones de nuevos casos, de los cuales 860.000 son en hombres y 1.200.000 en mujeres [4, 7, 13].

La patología es compleja y se presenta con una amplia gama de manifestaciones clínicas que se producen por la evolución de una intensa lucha entre el sistema inmune del hospedador vertebrado y los mecanismos de evasión del parásito para sobrevivir a expensas de aquel; es decir, la sintomatología clínica depende, tanto de factores inherentes al parásito como de la susceptibilidad o resistencia del hospedador [6].

Existen evidencias de la participación de factores genéticos en la susceptibilidad a esta enfermedad. En el ratón, por ejemplo, se ha demostrado que algunas cepas congénicas, tales como BALB/c, son muy susceptibles a la infección por *L. major* desarrollando lesiones progresivas con metástasis, y como su sistema inmune no tiene éxito en el control de la enfermedad se produce la muerte de los animales; mientras que la leishmaniasis se desarrolla como una enfermedad más bien benigna con autocuración en ratones de la cepa C57BL/6, en los que se monta una eficiente respuesta del sistema inmune. Esta resistencia o susceptibilidad a la infección depende de la respuesta específica de los linfocitos T *helper* CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Th1 ó Th2 respectivamente [7].

De esta manera, en ratones resistentes como los C57BL/6 ocurre una inducción y expansión de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Th1, que secretan específicamente interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Esta citocina activa la enzima inducible óxido nítrico sintasa (NOS2) en el macrófago infectado generándose un incremento del óxido nítrico (NO) en los fagolisosomas de los macrófagos, que es tóxico para el parásito. Por el contrario, la susceptibilidad a la infección por *Leishmania* característica de la cepa murina BALB/c resulta del desarrollo de una respuesta T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Th2. Estos linfocitos Th2 específicos, secretores de las citocinas: IL-4, IL-10, IL-13 son incapaces de activar al macrófago para que inhiba el crecimiento de *Leishmania*, por el contrario activan básicamente células cebadas, basófilos y eosinófilos, típicas de una respuesta contra helmintos, artrópodos y de procesos alérgicos [2, 7, 8].

Al mismo tiempo, el género es uno de los factores del hospedador mamífero que puede cumplir un papel importante en la patogenia y se acepta que la interconexión entre los sistemas endocrino e inmune tiene profundas implicaciones fisiopatológicas y evolutivas [11]. Algunas evidencias experimentales demuestran la influencia del sexo en el curso de las enfermedades parasitarias, y en muchas especies, que incluyen al humano y a los ratones, se encuentra que tanto la incidencia como la severidad de la infección natural son diferentes entre machos y hembras [3]. Obviamente las causas de estas diferencias son muy variadas e influye por ejemplo, el diverso grado de exposición de ambos géneros al parásito así como

otros aspectos socio-culturales o etológicos. No obstante, bajo las condiciones relativamente controladas de laboratorio se observa una marcada dicotomía en la susceptibilidad de machos y hembras ante una amplia gama de parásitos, por esta razón se acepta que uno de los tantos componentes en estos procesos patológicos es el ambiente hormonal interno [3, 11]. De esta manera, estudios que relacionan a las hormonas sexuales y los parásitos muestran una clara influencia, directa e indirecta, del sexo en el curso de la enfermedad parasitaria, pero a pesar del gran número de observaciones sobre los patrones determinados por la edad y el sexo en estas patologías, es muy escasa la presentación de un análisis sobre las causas de estas observaciones. Sin embargo, una visión general de tales reportes permite concluir, con algunas excepciones, que los machos son más susceptibles a las enfermedades parasitarias que las hembras, y que la preñez disminuye la relativa resistencia de las hembras ante este tipo de enfermedades [3]. En este contexto resulta muy interesante la respuesta inmune relacionada con el sexo observada en individuos afectados por parásitos del género *Leishmania*, debido a que los reportes indican que la susceptibilidad determinada por el género no sólo depende de la especie o cepa del parásito, sino que también está profundamente influida por el componente genético del hospedador [3]. En este sentido, se puede observar, por ejemplo, que la leishmaniasis recidiva producida por *L. tropica* afecta principalmente a las mujeres, pero la leishmaniasis visceral causada por *L. donovani* es más común en hombres que en mujeres. Por otro lado, en ratones de la cepa DBA/2 se observa una respuesta de los géneros opuesta dependiendo de la cepa de *Leishmania* infectante; así los machos son muy susceptibles a *L. mexicana* pero resistentes a *L. major*, mientras que las hembras son resistentes a la primera pero susceptibles a ésta última cepa del parásito [3, 11].

Enmarcado en este contexto, en este trabajo se estudió la influencia del género en el desarrollo de las alteraciones patológicas en la leishmaniasis experimental, al observar el curso del tamaño de la lesión y el patrón inmunohistopatológico en piel, ganglios linfáticos, hígado y bazo de ratones consanguíneos C57BL/6 infectados con parásitos de la cepa AZV de *Leishmania mexicana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se utilizaron treinta ratones de la cepa C57BL/6, quince machos y quince hembras, obtenidos del bioterio de la Universidad de los Andes (U.L.A), Mérida, Venezuela. Los amastigotes de *Leishmania mexicana* cepa AZV [10], fueron cedidos por el laboratorio de Inmunología de Parasitosis de la Facultad de Ciencias de la U.L.A, Mérida, Venezuela, fueron mantenidos por pasajes *in vivo* en hámsters dorados, a su vez obtenidos del mismo bioterio. Los amastigotes utilizados para inocular los ratones se tomaron de lesiones no ulceradas de hámster que fueron disecadas asépticamente. El tejido se maceró utilizando un mortero que contenía tampón fos-

fato isotónico estéril a 4°C. Los parásitos presentes en el homogeneizado fueron contados por tres (3) observadores en hemocitómetro y la concentración fue ajustada al tamaño del inóculo requerido.

Dos grupos, con una edad comprendida entre ocho (8) y doce (12) semanas, de quince ratones C57BL/6 fueron inoculados subcutáneamente en la superficie dorsal de la pata derecha posterior con  $10^4$  amastigotes suspendidos en un volumen de 20  $\mu$ L de solución fisiológica 0,85%, utilizando una pipeta "Hamilton" con aguja modificada con un bisel. La pata contralateral izquierda no fue inoculada.

Los ratones infectados fueron examinados semanalmente prestando particular atención al estado de la lesión en el sitio de inoculación. Las lesiones se midieron utilizando un calibre de precisión (DRAPPER). El tamaño de las lesiones se estimó de acuerdo a la diferencia entre el tamaño de la pata inoculada y la contralateral. Con la finalidad de realizar un análisis histopatológico de la lesión en los tejidos, a las trece (13) semanas post-inoculación se sacrificaron todos los ratones sometidos al estudio. A los animales sacrificados se les tomó muestras de piel sana e infectada, ganglio de drenaje de la lesión y el contralateral, bazo e hígado. Los tejidos se incluyeron en el medio de montaje OCT y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron seccionados a 4  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un criostato (Leyca). Se colocaron en cada lámina portaobjetos recubiertas con Poly-L lisina, cuatro (4) cortes no seriados del tejido correspondiente.

Los tejidos se trataron con la coloración de rutina Hematoxilina-Eosina (H y E) para estudiar: alteraciones epidérmicas y de la dermis papilar y profunda, tipo de infiltrado, presencia de necrosis, edema, granulomas, vasculitis. En el resto de los órganos se estudió: pérdida de la arquitectura normal, tipo de infiltrado, presencia de necrosis, edema, granulomas y vasculitis.

Además se realizó un estudio inmunohistoquímico (ICQ) de los tejidos utilizando la tinción de inmunoperoxidasa indirecta. Como fuente de anticuerpos primarios se utilizó suero policlonal contra *L. mexicana* cepa AZV producido en conejo ( $\alpha$ -*Leishmania*), desarrollado en el laboratorio de Inmunología de Parasitosis de la Facultad de Ciencias de la U.L.A, Mérida, Venezuela, y como anticuerpo secundario se utilizó  $\alpha$ -IgG de conejo producido en cabra acoplado a peroxidasa (SIGMA). La presencia y distribución de los amastigotes en la lesión se determinó usando el sustrato cromogénico de la peroxidasa (AEC). El patrón de reactividad de la inmunotinción se describió de acuerdo a las características de los depósitos (localización, extensión e intensidad), estructuras tisulares y células involucradas. Se usó una escala cualitativa para medir la reactividad de las inmunotinciones.

#### Análisis estadísticos

Los resultados se analizaron usando los estadísticos del modelo general lineal para medidas repetidas, contenido en el paquete estadístico SPSS 10,0 para Windows.

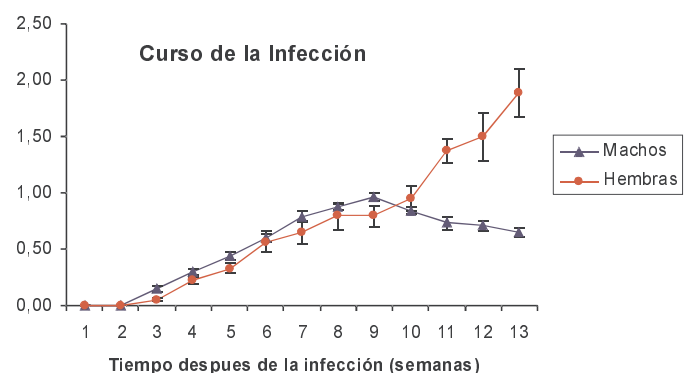
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evolución del tamaño de la lesión

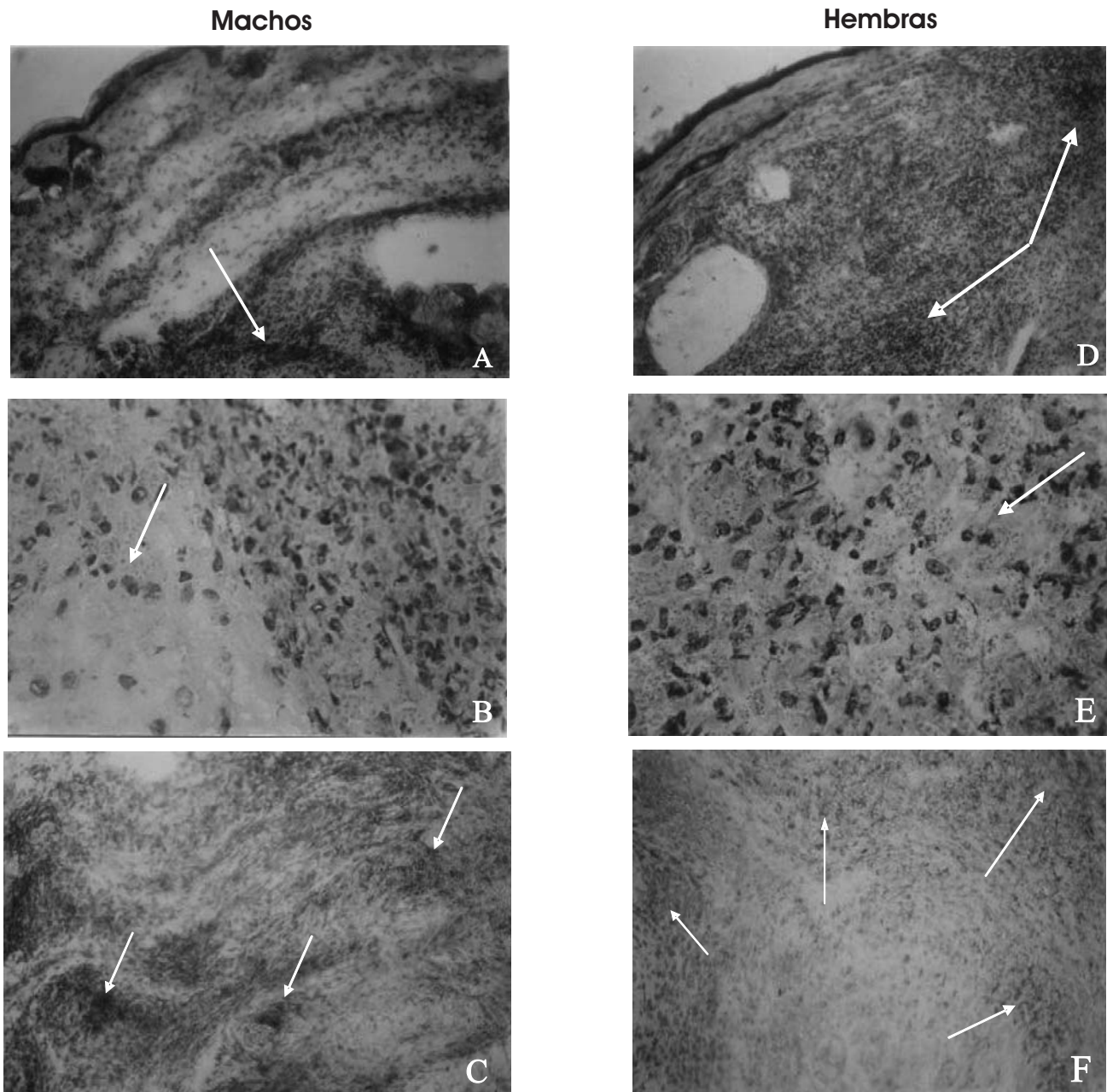
En ambos sexos la lesión se comenzó a apreciar a la tercera semana, registrándose un aumento de volumen sostenido hasta la semana nueve, a partir de la cual, se observó que la progresión del tamaño de la lesión de ambos géneros divergió notablemente. Por un lado en los machos se registró una marcada disminución en el tamaño de la lesión, mientras que en las hembras se observó un sensible aumento progresivo en el tamaño de la misma hasta el final del experimento (FIG. 1). Al comparar la evolución del tamaño relativo de las lesiones en los ratones sometidos al estudio, durante las trece (13) semanas de infección, se registraron diferencias estadísticamente significativas en el curso de la lesión entre ambos géneros ( $F= 6,080$ ;  $P<0,05$ ), y para el final del ensayo, el tamaño de la lesión en las hembras era tres veces mayor que en los machos.

De esta manera, los resultados mostraron que el género influyó en la respuesta inflamatoria y se observó que a partir de la semana nueve (9) fue el punto crítico a partir del cual, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se consolidaron las diferencias entre ambos géneros. Para el final del experimento (semana trece), la lesión evolucionó favorablemente en los machos hacia una resolución; mientras que en las hembras sólo se apreció incremento en el tamaño de la lesión. En este sentido se puede acotar que la influencia del sexo en las patologías causadas por parásitos protozoarios es compleja, y aunque las hembras tiendan a ser más resistentes a algunas infecciones, los machos, son más resistentes a otras [3].

Transcurridas trece semanas post-infección se registraron alteraciones patológicas en las muestras analizadas. En los machos el cuadro inflamatorio fue severo y comprometió a la epidermis en la región dorsal observándose pústulas acompañadas de paraqueratosis y necrosis. Un infiltrado predominantemente mononuclear ocupó gran parte de la dermis, el sub-cutáneo y el intersticio muscular (FIG. 2A). Se evidencia-



**FIGURA 1. TAMAÑO SEMANAL PROMEDIO (CM.) DE LAS LESIONES DE RATONES C57BL/6 MACHOS (N=15) Y HEMBRAS (N=15) INFECTADOS CON  $10^4$  AMASTIGOTES DE *L. Mexicana*. LAS LÍNEAS VERTICALES REPRESENTAN EL ERROR ESTÁNDAR. \* $P < 0,05$ .**



**FIGURA 2. IMÁGENES HISTOPATOLÓGICAS DE CORTES DEL MIEMBRO INOCULADO DE RATONES C57BL/6 MACHOS Y HEMBRAS, A LAS 13 SEMANAS POST-INFECCIÓN (2): A. PANORÁMICA DE REGIÓN DORSAL DE MACHOS MOSTRANDO ABUNDANTE INFILTRADO (+++) (FLECHA), H Y E X 125. B. AMASTIGOTES (FLECHA) EN PIEL DE MACHOS (++) , H Y E X 500I. C. PANORÁMICA DE REGIÓN DORSAL DE MACHOS CON INTENSA INMUNOREACTIVIDAD (+++) CON EL AC Á-LEISHMANIA (FLECHAS), X 500I. D. PANORÁMICA DE REGIÓN DORSAL DE HEMBRAS MOSTRANDO INFILTRADO MUY ABUNDANTE (FLECHAS) (++++), H Y E X 125. E. ABUNDANTES AMASTIGOTES (FLECHA) EN PIEL DE HEMBRAS (++++), H Y E X 500I. F. PANORÁMICA DE REGIÓN DORSAL DE HEMBRAS CON INMUNOREACTIVIDAD MUY ACENTUADA Y DIFUSA (++++ ) CON EL AC Á-LEISHMANIA (FLECHAS), X 500I.**

ron focos necróticos en dermis profunda y cuadros de vasculitis con diapedesis de mononucleares. En dermis, a nivel de los granulomas y tejido circundante se observó una moderada cantidad de amastigotes intra y extracelulares (++) (FIG. 2B). La inmunohistoquímica reveló un patrón de inmunoreactividad acentuada (+++) con el Ac  $\alpha$ -*Leishmania* en el infiltrado que

forma el granuloma pobremente organizado; en algunas regiones la intensidad fue menor o desapareció, la extensión de la inmunoreactividad abarcó parte del infiltrado observado en los cortes (FIG. 2C).

En general, el cuadro inflamatorio en las hembras fue más severo. A nivel epidérmico se observó paraqueratosis,

pústulas, úlceras y necrosis en grado variable. En dermis se encontró un infiltrado mixto extremadamente abundante entre mononucleares y neutrófilos (++++) (FIG. 2D), acompañado de zonas de aspecto vacuolado con abundante edema. Estos animales presentaron granulomas pobremente organizados en dermis profunda dorsal, que estaban rodeados por el infiltrado anteriormente descrito y también se visualizaron focos necróticos en dermis profunda y sub-cutáneo. Se observaron abundantes amastigotes intra y extracelulares (++++) (FIG. 2E). La inmunoreactividad para el Ac  $\alpha$ -*Leishmania* fue muy acentuada (++++) y difusa sobre todo el infiltrado, aunque en las zonas donde el exudado celular era menor o con más edema la intensidad disminuyó parcialmente (FIG. 2).

Al analizar los resultados se observa que las diferencias encontradas entre ambos sexos son evidentes, tanto en el curso del tamaño de la lesión, imagen histopatológica y patrón de inmunoreactividad contra el parásito. Pero es oportuno mencionar que la compleja relación entre el hospedero y el parásito aún no ha permitido dilucidar con precisión los mecanismos responsables de la respuesta diferencial entre machos y hembras ante diversos retos parasitológicos [3] y en este sentido, varios autores han aportado datos tendientes a encontrar la explicación para este dimorfismo en la respuesta a los parásitos del género *Leishmania* [3, 5, 9, 11, 12, 14]. De esta manera, algunos reportes demuestran que las hormonas sexuales actúan sobre las células del sistema inmune, modulando su respuesta, bien sea mediante unión directa a un receptor de alta afinidad específico para la hormona o por otras vías de manera indirecta [3, 15].

A pesar de estas dificultades, es posible considerar asociaciones alternativas lógicas, sobre algunos factores que influyan en esta respuesta diferencial, y como lo señalan Roberts y col. [11], los receptores específicos para estrógenos presentes en el macrófago permiten que la hormona module la capacidad defensiva del mononuclear, y entre los efectos atribuidos a los estrógenos sobre el fagocito mononuclear resalta la acción potenciadora sobre la capacidad fagocítica y la cantidad de intermediarios reactivos del oxígeno; pero resulta particularmente interesante el efecto inhibitorio de los estrógenos en la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno. Aunque esta evidencia experimental fue establecida al estudiar el efecto de los estrógenos sobre los macrófagos, este efecto puntual de la hormona, pudiese contribuir en la limitada capacidad de los ratones hembras de la cepa C57BL/6 para controlar la patología, ya que se conoce que en los múridos el óxido nítrico (NO) es fundamental para eliminar al parásito [2, 6, 13]. De este modo, al conectar las evidencias experimentales obtenidas, con este señalamiento, se podría proponer una secuencia de eventos que se traducen en un cuadro patológico con mayores alteraciones en las hembras estudiadas; de esta manera, la mayor cantidad de parásitos en los tejidos de las hembras pudiese estar relacionada con los niveles circulantes de estrógenos; y la respuesta de éstas podría ser el resultado de una mayor actividad fagocítica

por parte de sus macrófagos que favorece a *Leishmania* porque este parásito no posee mecanismos activos de ataque, y por lo tanto ingresa a la célula blanca cuando es fagocitada [6, 13]. Pero al mismo tiempo, la estimulación de la fagocitosis está combinada con una disminución en la capacidad leishmanicida de estos mononucleares parasitados producto de los "bajos" niveles de NO en la vacuola parasitofórica de estas células causados por los niveles circulantes de estrógenos en los ratones hembras [2, 6, 13].

Por otro lado, a nivel del ganglio poplíteo de drenaje del miembro posterior no inoculado, no se observó en ninguno de los ratones sacrificados reacción inflamatoria, y tampoco se pudo evidenciar la presencia de parásitos en este ganglio de drenaje contralateral. Sin embargo, en el ganglio poplíteo de drenaje del miembro inoculado se observó hiperplasia folicular con grandes centros germinales y en algunos animales se presentó pérdida de la arquitectura normal del órgano. En todos los animales sometidos al estudio se logró detectar, por inmunotinción para el Ac  $\alpha$ -*Leishmania*, la presencia de amastigotes en el interior de mononucleares, pero no se encontraron diferencias en la cantidad y/o distribución de los mismos entre los diferentes animales analizados (FIG. 3 A y 3 B), lo que indica que el parásito llega al ganglio de drenaje por lo menos antes de las trece semanas post-inoculación, este resultado no es inesperado y coincide con el reportado por Aguilar y col. [1].

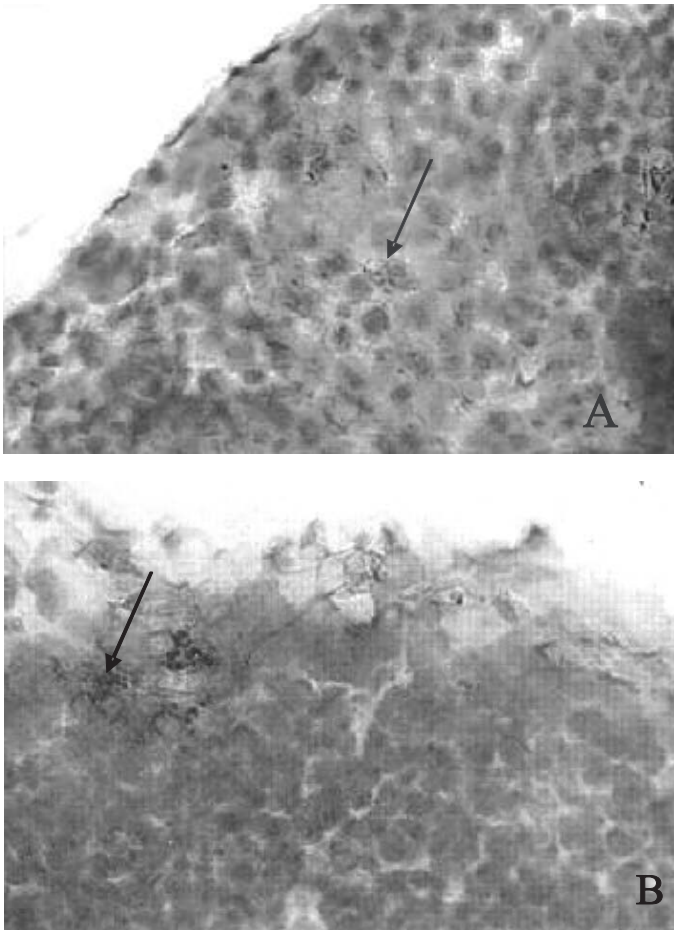
Por último, bajo las condiciones experimentales utilizadas, tanto en el hígado como en el bazo de ninguno de los ratones sacrificados, se observaron alteraciones relacionadas con la presencia del parásito y además no se evidenció la presencia de amastigotes en estos tejidos. Estos resultados son compatibles con los de Aguilar y col. [1], quienes no lograron detectar antígenos del parásito o visualizar amastigotes en dichos órganos a lo largo de veinticuatro (24) semanas de estudio en ratones de la cepa C57BL/6.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que el sexo es un factor importante en el desarrollo de la leishmaniasis experimental de ratones C57BL/6 inoculados con  $10^4$  amastigotes de *L. mexicana* cepa AZV, ya que las hembras presentaron mayor tamaño de las lesiones, alteraciones histopatológicas más severas y mayor cantidad de amastigotes en piel por inmunotinción con el Ac  $\alpha$ -*Leishmania*.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), de la Facultad de Ciencias de la ULA y del bioterio de la ULA, por su valiosa colaboración en la realización de este estudio.



**FIGURA 3. PARÁSITOS INMUNOREACTIVOS EN GANGLIOS POPLÍTEOS DE DRENAJE DE MIEMBROS INOCULADOS DE RATONES C57BL/6 INFECTADOS CON *L. mexicana*. SE OBSERVÓ INMUNOREACTIVIDAD CON EL AC Á-*LEISHMANIA* (FLECHAS), A LAS 13 SEMANAS POST-INFECCIÓN, A MACHOS Y B HEMBRAS, X 800I.**

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUILAR, F.; LAMBOT, M.; LAMAN, J.; VAN MEURS, M.; KISS, R.; NOEL, J.; CARLIER, Y. 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.** 66: 273-279. 2002
- [2] ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.; RUSSELL, D. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.** 112: 2993-3002. 1999.
- [3] ALEXANDER, J.; STIMSON, W. Sex Hormones and the Course of Parasitic Infection. **Parasitol. Today.** 7: 189-193. 1988.
- [4] ASHFORD, R. The leishmaniasis as emerging and re-emerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** 30: 1269-1281. 2000.
- [5] BILBO, S.; NELSON, R. Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian Hamsters. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Com. Physiol.** 280: R207-R213. 2001.
- [6] HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.** 44: 1-39. 2000.
- [7] HERWALTD, B. Leishmaniasis. **Lancet.** 354: 1191-1199. 1999.
- [8] LIRA, R.; DOHERTY, M.; MODI, G.; SACKS, D. Evolution of Lesion Formation, Parasitic Load, Immune Response, and Reservoir Potential in C57BL/6 Mice following High and Low-Dose Challenge with *Leishmania major*. **Infect. Immun.** 68: 5176-5182. 2000.
- [9] MOCK, B.; NACY, C. Hormonal Modulation of Sex Differences in Resistance to *Leishmania major* Systemic Infections. **Infect. Immun.** 56: 3316-3319. 1988.
- [10] PÉREZ, H.; LABRADOR, F.; TORREALBA, J. Variation in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. **Int. J. Parasitol.** 9:27-32. 1979.
- [11] ROBERTS, C.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 476-488. 2001.
- [12] SATOSKAR, A.; ALEXANDER, J. Sex-determined susceptibility and differential IFN- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. **Immunol.** 84: 1-4. 1995.
- [13] SOLBACH, W.; LASKAY, T. The Host Response to *Leishmania* Infection. **Adv. Immunol.** 74: 275-317. 2000.
- [14] TRAVI, B.; OSORIO, Y.; MELBY, P.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIA, N. Gender Is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with *Leishmania* spp. **Infect. Immun.** 70: 2288-2296. 2002.
- [15] WILCOXEN, S.; KIRKMAN, E.; DOWDELL, K.; STOHLMAN, S. Gender-Dependent IL-12 Secretion by APC Is Regulated by IL-10. **J. Immunol.** 164: 6237-6243. 2000.