

ARTICULO

Establecimiento de un sistema in vitro para el cultivo de *Leishmania chagasi/ infantum* en macrófagos de perro

Caamaño M¹, Carrasquel E¹, Gutiérrez C N.^{1,2} y Agrela, IF.^{1,2}

¹Dpto. de Microbiología Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, Universidad de Carabobo.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED).

Correspondencia: Irma Agrela

E-mail: agrelairma@hotmail.com
agrelairma@yahoo.es

Financiamiento: CDCH de la Universidad de Carabobo, proyecto 96-014 y la Fundación para la Ciencia y Tecnología (FUNDACITE) proyecto número 2002-FRH-0118071

Recibido: Junio 2007 **Aprobado:** Octubre 2007

RESUMEN

Se han publicado pocos estudios donde se utilizan macrófagos de perro para el cultivo *in vitro* de *Leishmania chagasi/infantum*. El uso de macrófagos caninos para obtener amastigotas permite el estudio de la biología de esta forma parasitaria en el interior de su célula hospedadora. Con la finalidad de determinar las condiciones adecuadas para el establecimiento de un sistema *in vitro* que permita el cultivo de amastigotas de *L. chagasi/infantum*, el agente etiológico de la leishmaniasis visceral americana, macrófagos de perro pertenecientes a la línea celular continua DH82 fueron infectados usando promastigotas bajo diferentes condiciones. Se observó que aunque las células ingerieron rápidamente los promastigotas, los parásitos fueron transformados en amastigotas y los macrófagos fueron capaces de soportar la replicación intracelular de los amastigotas. En la fase de crecimiento celular, la proporción parásito:célula y la temperatura de incubación afectan el porcentaje de células infectadas. Los porcentajes de infección más elevados se obtuvieron al infectar monocapas de cultivo en fase estacionaria, utilizando una proporción parásito:célula de 50:1 e incubando a 33 °C; lo cual sugiere que estas son las condiciones ideales para el desarrollo del cultivo *in vitro* de estas amastigotas. Los hallazgos abren la posibilidad de utilizar esta línea celular en el estudio de las interacciones parásito-hospedador y en la evaluación de drogas con potencial leishmanicida.

Palabras clave: *Leishmania chagasi*, amastigotas, línea celular DH82, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Establishing an *in vitro* system for culturing *Leishmania chagasi/infantum* in dog macrophages

Few *in vitro* studies for culturing *Leishmania chagasi/infantum* in dog macrophages have been published. The use of canine macrophages to obtain amastigotes allows the study of the biology of this parasitic form in the host cell. In order to determine the conditions suitable for the establishment of an *in vitro* system for culturing *Leishmania chagasi/infantum* amastigotes, the etiological agent of American Visceral Leishmaniasis, dog macrophages belonging to the continuous cell line DH82 were infected using promastigotes under different conditions. It was observed that, although cells ingested promastigotes very quickly, the parasites were transformed into amastigotes and the dog macrophages were able to withstand intracellular replication of the amastigotes; moreover. In the cellular growth phase, the parasite:cell ratio and the incubation temperature have an influence on the percentage of infected cells. The highest infection rates were obtained when infected monolayer cells were in a stationary phase, using 50:1 parasite:cell ratio, and incubating at 33°C, which suggests that these are the ideal conditions for developing the *in vitro* culture of these amastigotes. These findings open the possibility of using this cell line in the study of parasite-host interactions, as well as evaluating drugs with a potential as a leishmanicide agent.

Key words: *Leishmania chagasi*, amastigotes, cell line DH82, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en diversos países, es causada por varias especies de protozoarios, todas incluidas en el género *Leishmania*. Estos protozoarios se presentan bajo dos formas evolutivas que difieren desde el punto de vista morfológico y funcional. En los hospedadores invertebrados, los parásitos del género *Leishmania* se presentan como formas extracelulares, alargadas y flageladas denominadas promastigotas y como amastigotas intracelulares, redondeadas y aflageladas en el interior de los fagolisomas dentro de las células del sistema reticuloendotelial de los mamíferos que infectan (1), siendo ésta la forma parasitaria responsable de las manifestaciones clínicas.

El hecho de que los promastigotas sean fácilmente cultivados *in vitro* ha determinado que la mayor parte de nuestro conocimiento acerca de la biología molecular y bioquímica de este protozooario esté relacionado con este estadio. No obstante, debido a las implicaciones para la salud humana, gran parte de la investigación está siendo dirigida hacia el conocimiento del estadio intracelular, el amastigota, por ser ésta la forma parasitaria responsable de la enfermedad en el hospedador vertebrado.

Desde hace mucho tiempo se han obtenido amastigotas a partir de animales de laboratorio infectados experimentalmente. No obstante, este procedimiento resulta costoso, laborioso y de bajo rendimiento. También, se ha documentado diferencias importantes en la infectividad de algunas especies de *Leishmania* en hámsters y ratones BALB/c (2).

Otro enfoque dirigido hacia la obtención de amastigotas está fundamentado en el establecimiento y mantenimiento de cultivos axénicos (3-7), esta metodología implica el aumento de la temperatura en combinación con una

disminución del pH del medio en presencia o no de CO₂ (8). Las condiciones de pH y temperatura que permiten la diferenciación de promastigotas a amastigotas extracelulares en una especie pueden no ser adecuadas para otra y, en consecuencia, se requiere de condiciones individuales para cada especie y/o cepa (9-11). Por otro lado, los amastigotas obtenidos parecen ser muy semejantes a los observados en las lesiones de animales infectados experimentales desde el punto de vista morfológico y ultraestructural, en algunos antígenos de superficie y en su infectividad (12, 13).

Por otra parte, la diferenciación, maduración y replicación de los amastigotas de *Leishmania* se ha observado *in vitro* utilizando cultivos celulares de fibroblastos (14, 15) y en líneas celulares derivadas de células embrionarias de *Lutzomyia longipalpis* (16), el principal vector de la leishmaniasis visceral en el continente americano.

Sin embargo, debido a que los parásitos del género *Leishmania* se multiplican en el interior de células del sistema fagocítico-mononuclear de los vertebrados que infectan, los macrófagos obtenidos de diferentes sitios anatómicos de varios animales o aquellos mantenidos bajo condiciones de cultivo continuo representan un enfoque mucho más real. La metodología antes citada ha sido utilizada por varios investigadores (17-24) y proporciona un modelo de gran ventaja, ya que permite el estudio de los factores determinantes de la virulencia de estos parásitos, el papel que juega la relación hospedador-parásito en el desarrollo de la enfermedad y el efecto de drogas antileishmanicas potenciales sobre amastigotas en su célula hospedadora.

La presente investigación tuvo como objetivo establecer un sistema *in vitro* para el cultivo de amastigotas de *L. chagasi/infantum*, el agente etiológico de la leishmaniasis visceral en el continente americano, utilizando macrófagos de perro pertenecientes a la línea celular DH82.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Parásitos: se utilizó la cepa de *Leishmania chagasi/infantum* MHOM/BR/PP75, la cual fue mantenida en cultivo bifásico *in vitro* usando agar sangre de conejo al 10% con medio LIT (Liver Infusion Tryptose). En ensayos preliminares se determinó que la fase logarítmica del crecimiento de los parásitos se ubicó entre el tercero y cuarto día.

Células: La línea celular continua de macrófagos caninos DH82 usada en este estudio, fue adquirida de America Type Culture Collection (ATCC CRL-10389) y se procedió de acuerdo a la metodología descrita por Dawson et al. (25). Las células fueron mantenidas en medio mínimo esencial (MEM) con sales de Earle (Sigma Chemical Company), suplementando con 1,2 g/100 mL de glutamina (200 mmol/L) (Hyclone), 6 g/100 mL de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Hyclone) y 8 mg/100 mL de gentamicina; incubadas a 37°C sin atmósfera de CO₂. Los cultivos se revisaron a diario mediante microscopio invertido y el medio de cultivo se cambió cada 48 a 72 horas. En ensayos previos se determinó que la fase logarítmica estuvo comprendida entre el cuarto y sexto día de iniciado el cultivo y siete a ocho días después del inicio de los cultivos se alcanzó la fase estacionaria.

Efecto de la fase de crecimiento celular, proporción parásito:célula y la temperatura de incubación sobre las amastigotas: siguiendo la metodología descrita por Chang (20) con algunas modificaciones, se procedió a infectar los macrófagos de la línea celular continua DH82 con promastigotas de *Leishmania chagasi/infantum*, cuando los parásitos se encontraban en fase logarítmica de crecimiento. El medio empleado para el mantenimiento de las células infectadas fue el mismo utilizado para la línea celular con la diferencia que fue suplementado con 20% de SFB.

Para la infección de las células se procedió de la siguiente manera: a) Se desprendió la monocapa de un cultivo celular en fase estacionaria, se realizó recuento celular y se añadió 5 mL de la suspensión celular, los cuales contenían aproximadamente 3×10^6 células (día cero de la curva de crecimiento celular) a tres frascos de cultivo de 25 cm², luego se agregaron los parásitos a razón de 10, 25, y 50 parásitos por célula. Finalmente, los cultivos fueron incubados a una temperatura 33°C.

b) Por otra parte, se emplearon cultivos de la línea celular en fase estacionaria sin desprender la monocapa con aproximadamente 8×10^6 células (octavo día de la curva de crecimiento celular). Posteriormente, se agregaron los parásitos resuspendidos en el medio de cultivo a razón de 10, 25, y 50 parásitos por célula, incubando los cultivos a las temperaturas de 33 y 37°C.

En ambos casos los cultivos de macrófagos infectados fueron observados diariamente usando un microscopio invertido con la finalidad de examinar la cantidad de parásitos libres y para estimar el porcentaje de infección se examinaron al menos 100 macrófagos mediante frotis preparados por citocentrifugación y teñidos con Giemsa modificado (Dip Quick Satín de Jorgensen Laboratorios, Inc.) utilizando un microscopio compuesto con objetivo de inmersión (100X).

Microscopia electrónica: el estudio ultraestructural de las células infectadas y de los amastigotas intracelulares, se realizó de acuerdo a los descrito por Balanco et al. (12), con las siguientes modificaciones. La monocapa de un cultivo infectado se desprendió con un raspador mecánico y fue fijada con glutaraldehído al 1,25 g/100 mL, luego el paquete celular fue lavado 2 veces usando MEM base sin suplementar y, posteriormente, fue lavado una vez con buffer fosfato salino 10 mmol/L pH 7,2 para finalmente ser post-fijado con tetraóxido de osmio al 2 g/100 mL durante hora y media. El paquete celular resultante fue lavado, deshidratado en etanol y luego embebido en resina. Cortes finos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser examinados en un microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS

Ensayos de infección a macrófagos: los promastigotas de *Leishmania chagasi* fueron ingeridos por los macrófagos de la línea celular DH82 y luego de su ingestión, éstos fueron observados individualmente o en grupos en el citoplasma de la célula en su forma intracelular amastigota (Figura 1).

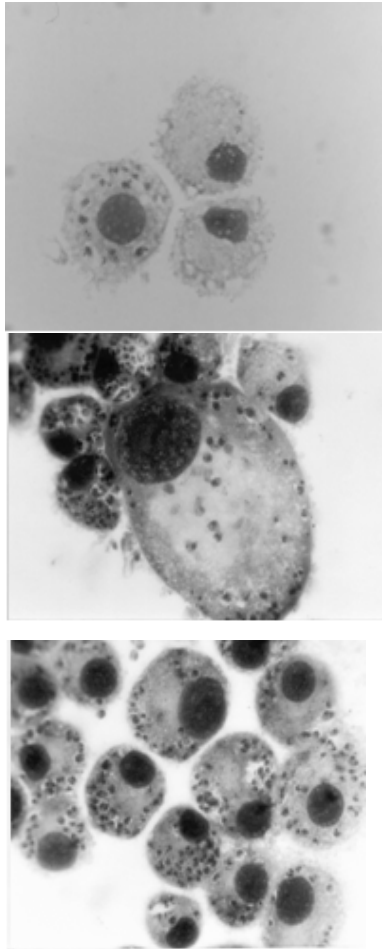


Fig. 1: Microfotografía de las células de la línea DH82 durante la infección experimental con amastigotas de *Leishmania chagasi/infantum*, teñidos con Giemsa modificado (1000x)

Efecto de la fase de crecimiento celular, proporción parásito:célula y la temperatura de incubación sobre las amastigotas: el porcentaje de infección obtenido al infectar células en el día cero de la curva de crecimiento (3×10^6) se muestra en la Figura 2A, en la cual se observa que la proporción de células infectadas varía según la proporción parásito: célula utilizada. Aunque los menores porcentajes de infección se observaron al usar las proporciones 10:1 y 25:1, con cualquiera de las proporciones parásito:célula utilizada, el porcentaje de infección disminuye significativamente a partir del cuarto día; esta reducción estuvo acompañada de la visualización en los frotis por citocentrifugación de un gran número de células en división.

Cuando la infección de los macrófagos se inicia utilizando las células durante la fase estacionaria se observó que independientemente de la proporción parásito:célula utilizada el porcentaje de infección obtenido es mucho más elevado que el obtenido al infectar células en el día cero de la curva de crecimiento (Figura 2B), en este caso el porcentaje de infección fue superior al 65% independientemente de la proporción parásito:célula. Por otra parte, al infectar los cultivos en la fase estacionaria la proporción 50:1 mostró mayor rendimiento, en este caso se observó que 95% de las células albergaron amastigotas tres días

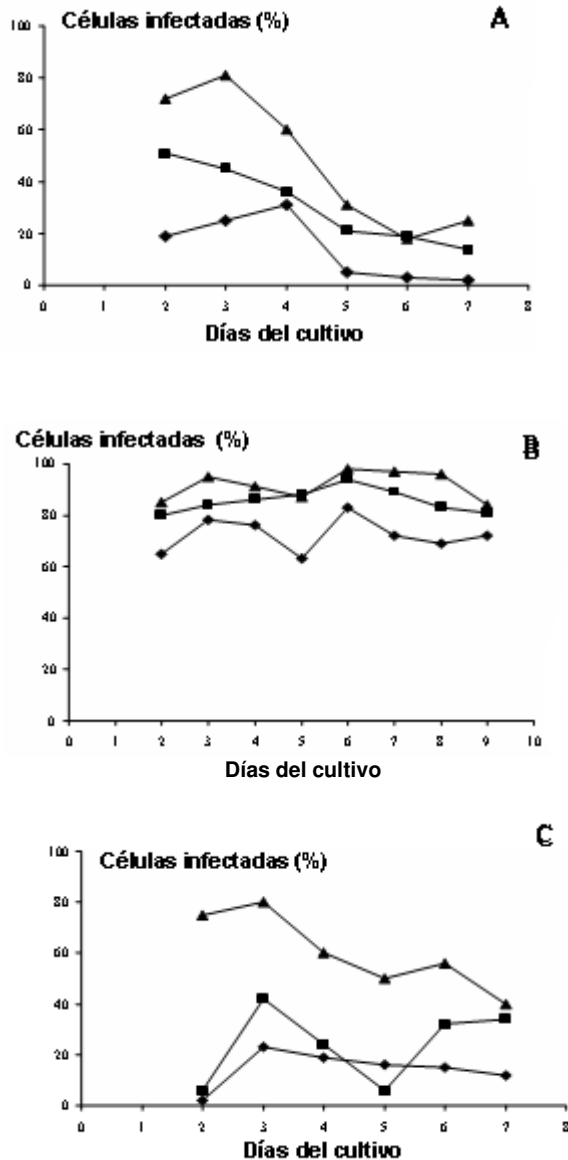


Fig. 2: Porcentaje de células de la línea celular DH82 infectadas con amastigotas de *Leishmania chagasi/infantum*. **A** = Cultivos iniciados en el día cero de crecimiento celular (3×10^6 células) e incubados a 33°C. **B** = Cultivos iniciados en fase estacionaria de crecimiento celular e incubados a 33°C. **C** = Cultivos iniciados en fase estacionaria de crecimiento celular e incubados a 37°C. En todos los casos se ensayaron tres proporciones parásito: célula (10:1 ●; 25:1 □; 50:1 ▲) después de la infección y que el porcentaje de infección se mantuvo dentro de un rango de valores más estrecho (80-98%) a lo largo del período de observación

Los cultivos iniciados usando monocapas en la fase estacionaria del crecimiento celular e incubados a 37°C mostraron una menor proporción de células infectadas que aquellos iniciados con monocapas pero incubados a 33°C, independientemente de la proporción parásito: célula utilizada. Al incubar los cultivos a 37 °C, se observó que con las proporciones 10:1 ó 25:1 el porcentaje de células infectadas fue inferior al 50% a lo largo del período de observación mientras que con la proporción de 50:1 se obtuvieron porcentajes de infección entre 80 y 40% los días tres y siete respectivamente (Figura 2C).

Estudio Ultraestructural: La figura 3A muestra una célula que contiene un parásito intacto. El amastigota mide 3,4 μm de largo y 1,9 μm de ancho, presenta un núcleo redondo que mide 1,2 μm de diámetro ubicado hacia uno de los polos del parásito con cromatina condensada en histonas, un nucleolo que mide 0,3 μm de diámetro y una bolsa flagelar en la cual se encuentra

invaginado el flagelo. Adicionalmente se observó en el citoplasma del amastigota vesículas de diferentes tamaños y densidades (Figura 3B).

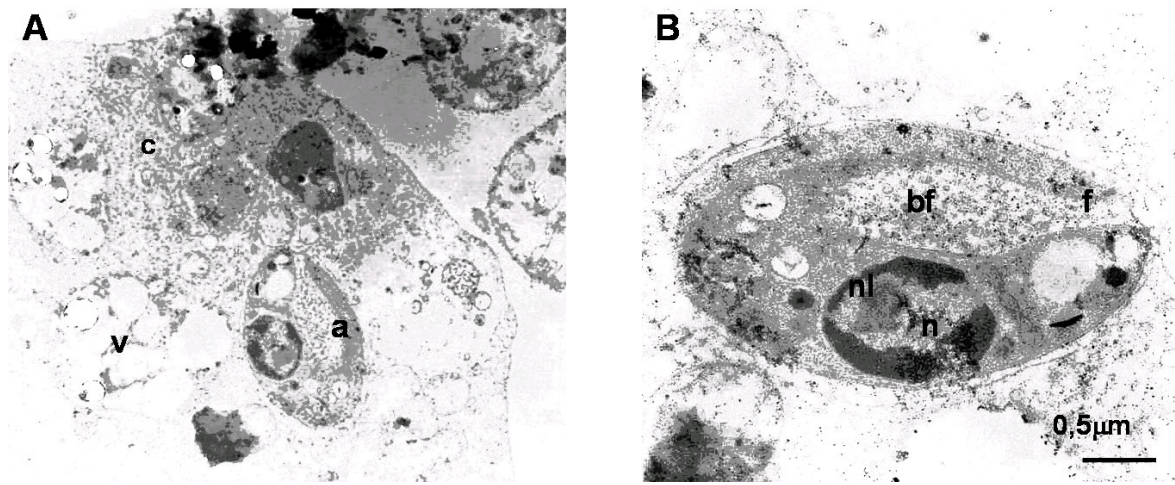


Fig. 3: Microfotografía de la ultraestructura de un amastigota intracelular por microscopía electrónica de transmisión. **A** = macrófago que contiene un amastigota (c: célula, a: amastigota, v: vacuola). 10.000x. **B** = detalle del amastigota (n: núcleo; nl: nucleolo, f: flagelo y bf: bolsa flagelar) 30.000 x.

DISCUSIÓN

El uso de macrófagos con el propósito de realizar estudios *in vitro* ha sido reportado por algunos investigadores (19-22,24) y su utilización representa una valiosa herramienta en el estudio de las relaciones parásito-hospedador en la leishmaniasis y la efectividad de drogas con potencial antileishmania ya que ofrecen simplicidad y rapidez en los resultados.

Los resultados aquí presentados, muestran que la fase de crecimiento celular utilizada para iniciar los ensayos de infección parece ser determinante en el rendimiento de los cultivos de amastigotas; así como también la proporción parásito:célula y la temperatura de incubación.

Al usar células en día cero de la curva de crecimiento e incubar las células a temperatura de 33°C se observó que el porcentaje de infección más alto se obtuvo al utilizar la proporción parásito: célula 50:1. Sin embargo, se pudo observar que independientemente de la proporción parásito:célula ensayada el porcentaje de infección comenzó a descender hasta llegar a valores similares a partir del cuarto día. Cuando las células fueron utilizadas en el día cero de la curva de crecimiento, se observaron abundantes células no infectadas en mitosis, los macrófagos parecen reproducirse muy rápidamente, empleando quizás un tiempo menor del que necesitan los amastigotas para multiplicarse, romper la célula hospedera e invadir nuevas células.

Una situación contraria fue observada al infectar cultivos celulares durante la fase estacionaria, donde independientemente de la proporción parásito:célula utilizada se obtuvieron porcentajes de infección mucho más elevados que aquel obtenido con los cultivos iniciados en el día cero de la curva de crecimiento. Esto podría tener relación con el uso de una línea celular continua durante el desarrollo de los ensayos aquí descritos; la mayoría de los investigadores que

han desarrollado modelos de infección a macrófagos *in vitro* con promastigotas utilizan cultivos celulares primarios (17,18,21,24,26,27), los cuales no tienen la capacidad de multiplicarse como sí lo hace una línea celular continua.

Existen evidencias de que el desarrollo intracelular de *Leishmania* spp está fuertemente afectado por la temperatura (20,26,27). Al evaluar este aspecto se observó que aunque los cultivos que fueron incubados a 37°C se estabilizaron en menor tiempo (24 horas), tanto el porcentaje de infección como el número de amastigotas disminuyó drásticamente durante el periodo de observación. Al contrario, cuando los cultivos fueron incubados a 33°C el número de amastigotas y el porcentaje de macrófagos infectados fue mucho mayor. Recientemente, se han infectado macrófagos peritoneales de perro con amastigotas de *L. chagasi*, los cuales se han mantenido a 34 °C, lográndose tasas de infección muy próximas al 100% (24); así mismo, para *L. mexicana* (agente etiológico de leishmaniasis cutánea) se ha encontrado que la función de ciertas enzimas involucradas con la síntesis de ARN está asociada con la temperatura (27). Posiblemente la reducción de la temperatura favorezca la entrada del parásito a la célula, su diferenciación y su supervivencia en el interior de los macrófagos, dada la depresión de la capacidad leishmanicida de los macrófagos (28,29,30).

Las microfotografías electrónicas muestran parásitos intactos en el interior de las células así como también muestran los detalles de la ultraestructura de los amastigotas obtenidos, evidenciando que la línea celular DH82, es apta para el desarrollo de los amastigotas de *Leishmania chagasi*.

El establecimiento de cultivos de amastigotas de *L. chagasi* en macrófagos de perros (línea celular DH82), el cual es considerado el principal reservorio del agente etiológico de la leishmaniasis visceral americana, representa una contribución muy valiosa para esta área de investigación, ya que el sistema propuesto proporciona una herramienta para el conocimiento de los mecanismos que permiten la supervivencia de estos parásitos en el interior del fagolisosoma de los macrófagos y la relación parásito-hospedador en el progreso de la enfermedad; así como también ofrece un modelo para el estudio del efecto de drogas con potencial antileishmania sobre la forma del parásito responsable de la patología.

Agradecimientos: Los autores quieren agradecer al Sr. Carlos González del Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Humberto Fernández Morán", Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, coordinado por el Dr. Mario Rossini por su colaboración durante el procesamiento de la muestra para los estudios ultraestructurales y a la Prof (a). Vilma Llovera, del Departamento de microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo-Sede Aragua por la revisión del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W. and Killick-Kendrick R. (editors). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press. London 1987; vol 1 p. 1 -120
2. Rey JA, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43: 623-31
3. Sereno D, Lemesre J. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 72-6

4. Callahan H, Portal A, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigotes system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 818-22
5. Teixeira MC, De Jesus Santos R, Sampaio RB, Pontes De Carvalho L, Dos Santos WL. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 2002; 88: 963-8
6. Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. *In vitro* cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms. *Acta Trop.* 2002; 37-42
7. Debrabant A, Joshi MB, Pimenta PF, Dwyer DM. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 205-17
8. Bates PA. Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today.* 1993; 9: 143-6
9. Eperon S, McMahon-Pratt D. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. *J Protozool.* 1989; 36: 502-10
10. Doyle PS, Engel JC, Pimenta PF, Da Silva PP, Dwyer DM. *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp Parasitol.* 1991; 73: 326-34
11. Gupta N, Goyal N, Rastogi A. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trend in Parasitol.* 2001; 17: 150-3
12. Balanco J, Pral E, Da Silva S, Bijovsky A, Mortara R, Alfieri S. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigotes-like stages. *Parasitology.* 1998; 116: 103-13
13. Bates P, Robertson C, Tetley L, Coombs G. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigotes-like forms. *Parasitology.* 1992; 105: 193-202
14. Pessotti JH, Zaverucha Do Valle T, Corte-Real S, Gonçalves Da Costa SC. Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the Vero cell line. *Parasite.* 2004; 11: 99-102
15. Nogueira YL, Nakamura PM, Galati EA. Kinetics of growth of *Leishmania (Leishmania) chagasi* cycle in McCoy cell culture. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006; 48: 337-41
16. Bello FJ, Mejía AJ, Corena M del P, Ayala M, Sarmiento L, Zuñiga C, Palau MT. Experimental infection of *Leishmania (L.) chagasi* in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 519-25
17. Chang K. Intracellular multiplication of *Leishmania donovani* during repeated passages in primary cultures hamster peritoneal macrophages. *J Parasitol.* 1978; 64: 931-3
18. Berman JD, Dwyer DM, Wyler DJ. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro*. *Infect Immun.* 1979; 26: 375-9
19. Berens R, Marr J. Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in a continuous macrophages-like cell culture. *J Protozool.* 1979; 26: 453-6
20. Chang K. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science.* 1980; 209: 1240-2
21. Chang KP, Bray RS, Leaney AJ. Infection of mouse macrophages *in vitro* by sandfly-derived promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75: 475-6
22. Mendez S, Nell M, Alunda J. *Leishmania infantum*: infection of macrophages *in vitro* with promastigotes. *Int J Parasitol.* 1996; 26: 619-22
23. Bosque F, Milon G, Valderrama L, Saravia N. Permissiveness of human monocytes and monocites-derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *J Parasitol.* 1998; 84: 1250-6
24. Madeira MF, Barbosa-Santos EGO, Marzochi MCA. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatropic *Leishmania* strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94: 645-8

25. Dawson J, Anderson B, Fishbein D, Sánchez J, Goldsmith C, Wilson K, Duntley W. Isolation and characterization of *Erlchia* sp. from a patient diagnosed with human earlichiosis. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2741-5
26. Berman J, Neva F. Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages *in vitro*. Am J Trop Med Hyg. 1981; 30: 318-21
27. Biegel D, Topper G, Rabinovitch M. *Leishmania mexicana*: temperature sensitivity of isolated amastigotes and amastigotes infecting macrophages in culture. Exp Parasitol. 1983; 56: 289-97
28. Scott P, Sacks D, Sher A. Resistance macrophage-mediate killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. J Immunol. 1983; 31: 966-71
29. Scott P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. Parasite Immunol. 1985; 7: 277-288
30. Kirkpatrick CE, Nolan TJ, Farrel JP. Rate of *Leishmania*-induced skin lesion development in rodents depends on the site of inoculation. Parasitology. 1987; 94: 451-65