

Susceptibilidad *in vitro* a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos

Macrófagos e infección por *Leishmania* spp

The susceptibility to infection by *Leishmania panamensis* and the sensitivity to drugs differ according to the macrophage type

Carol V. Mesa¹, Diana L. Muñoz¹, Mónica Echeverry¹, Iván D. Velez^{1,2}, Sara M. Robledo^{1,2}

RESUMEN

Introducción: Los sistemas *in vitro* son útiles en la evaluación de compuestos con actividad biológica, permitiendo por ejemplo, determinar el potencial citotóxico y leishmanicida de un compuesto. **Objetivo:** Identificar el tipo de célula mamífera que permita una óptima infección *in vitro* por *Leishmania* y que constituya el sistema adecuado para el tamizaje *in vitro* de compuestos con actividad anti-*Leishmania*. **Métodos:** La susceptibilidad de las células a infección por *L. panamensis* se evaluó según la Concentración Infecciosa 50 determinada por microscopía de luz y citometría de flujo; la supervivencia intracelular de los amastigotes se evaluó por microscopía de fluorescencia y la sensibilidad de las células a anfotericina B y antimoniato de meglumina se evaluó por espectrofotometría. **Resultados:** Los cultivos primarios son más susceptibles a la infección por *L. panamensis in vitro*. Sin embargo, la supervivencia intracelular del parásito fue mejor en U-937. Por su parte, la sensibilidad de las células a anfotericina B y antimoniato de meglumina vario según el tipo de célula. **Conclusiones:** Las células U-937 son las adecuadas para la infección por *Leishmania* porque: a) presentan crecimiento ilimitado y se les puede inducir transformación a macrófagos. b) la susceptibilidad a la infección por *Leishmania* es similar a la observada en cultivos primarios de macrófagos y c) permiten mayor supervivencia de los amastigotes luego de la infección. Adicionalmente, las células U-937 son menos sensibles a la acción de los fármacos comúnmente utilizados como control en la detección de compuestos con actividad leishmanicida. *Salud UIS* 2010; 42: 200-211

Palabras clave: Susceptibilidad a infección por *Leishmania*, células U-937, células THP-1, células Vero, células J774A,1, macrófagos

1. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET.

2. Facultad de Medicina Universidad de Antioquia.

Correspondencia: Sara M. Robledo R., Bacterióloga y Laboratorista Clínico, PhD. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 53 No. 61-30, Lab. 632. Tel: (574) 219 6503; FAX (574) 219 6511, E-mail: srobledo@guajiros.udea.edu.co.

Recibido: 30 de agosto de 2010 - **Aceptado:** 10 de diciembre de 2010

ABSTRACT

Introduction: *In vitro* systems are useful in the evaluation of compounds with biological activity determining the cytotoxic and leishmanicidal activity of the candidates. **Objective:** To identify the mammalian cell that allows the optimal *in vitro* infection by *Leishmania* and therefore, identify the suitable system for the *in vitro* evaluation of leishmanicidal activity of drugs. **Methodology:** The susceptibility to the infection by *L. panamensis* was evaluated according to the Infective Concentration 50 tested by light microscopy and flow cytometry; the intracellular survival of amastigotes was determined by fluorescence microscopy and the sensitivity to amphotericin B and meglumine antimoniate was evaluated by spectrophotometry. **Results:** The primary culture cells were more susceptible to the *in vitro* infection by *L. panamensis* because they did not require fewer parasites per cell ratio to achieve the 50% infection rate whereas the intracellular survival of parasites was better in the U-937 cells. All cells showed differential sensitivity to amphotericin B and meglumine antimoniate. **Conclusion:** The U-937 cells are the most suitable model for the *in vitro* infection by *L. panamensis* because: a) they are a cell line with unlimited growth where transformation into macrophages can be induced. b) The susceptibility to infection by *L. panamensis* is similar to that observed in primary cultures macrophages and, c) They allow the intracellular survival of amastigotes after the infection process. In addition the U-937 cells are less sensitive to the action of the commonly used drugs as a control in the screening of compounds with leishmanicidal activity. *Salud UIS* 2010; 42: 200-211

Keywords: Susceptibility to infection by *Leishmania*, U-937 cells, THP-1 cells, Vero cells, J774A.1 cells, macrophages

INTRODUCCIÓN

Leishmania es un parásito intracelular obligado que se replica en su forma de amastigote dentro de los fagolisosomas de los macrófagos en hospederos mamíferos, ocasionando tres formas clínicas diferentes, conocidas como leishmaniasis y que son: la leishmaniasis cutánea (CL) que se caracteriza por la presencia de ulceraciones profundas en la piel, generalmente indoloras, ubicadas principalmente en partes expuestas del cuerpo¹. La leishmaniasis mucosa (LM) y mucocutánea (LMC) caracterizada por la presencia de lesiones que comprometen las membranas mucosas de la boca, nariz, ó garganta principalmente, y cartilago del tabique, ocasionando en los pacientes desfiguración facial y estigmatización¹ y la leishmaniasis visceral (LV) que afecta el bazo, el hígado y la médula ósea; esta forma es la única que puede llegar a ser letal si no hay un tratamiento oportuno¹.

El tratamiento de la enfermedad en cualquiera de sus formas clínicas está dirigido a la erradicación de los amastigotes y reducción del tamaño de las lesiones, promoviendo la cura con mínimas cicatrices². Dicho tratamiento se realiza en primera instancia con compuestos de antimonio pentavalente como el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®), y en segunda instancia con otras drogas, como la anfotericina B (Fungizone®), el isotianato de la pentamidina y la miltefosina. Sin embargo, el empleo de dichos fármacos tiene varias desventajas que dificultan el tratamiento adecuado de los casos.

Entre los factores adversos a los tratamientos actualmente disponibles están los esquemas terapéuticos prolongados, con altas dosis de medicamentos y por vía parenteral (intramuscular o intravenosa, a excepción de la miltefosina que es de administración oral), los considerables efectos adversos tales como mialgias, artralgias, anorexia, náuseas y dolor de cabeza en el caso de los antimoniales, y los altos costos^{2,3,4}, estimulan que muchos pacientes no concluyan el tratamiento, lo que favorece la reactivación de la lesión, el compromiso en mucosas y la aparición de resistencia al medicamento⁵.

Todas las desventajas asociadas a los medicamentos disponibles han evidenciado la necesidad urgente de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para el manejo de la enfermedad, lo que implica trabajar en forma decidida en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. La identificación de compuestos potencialmente capaces de detener el crecimiento del parásito *Leishmania* y su multiplicación intracelular se realiza mediante sistemas de infección *in vitro* e *in vivo* (en modelos animales), para lo cual es fundamental contar con sistemas de evaluaciones adecuados que sean eficientes y eficaces en la identificación de compuestos con potencial actividad leishmanicida.

Actualmente se dispone de una variedad de ensayos para evaluar en sistemas *in vitro* la sensibilidad de las especies de *Leishmania* a un medicamento. Cada uno de estos ensayos puede realizarse utilizando cualquiera de los estadios del parásito obtenidos *in vitro*, esto es, promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes

intracelulares⁶. Aunque los ensayos en promastigotes son más fáciles de realizar por su fácil cultivo en laboratorio y menor costo, los ensayos en amastigotes intracelulares son los más adecuados, toda vez que estas formas parasitarias son las formas clínicamente relevantes para la evaluación de alternativas terapéuticas y adicionalmente, la respuesta observada en esta forma se correlaciona con la sensibilidad clínica⁵. Los sistemas *in vitro* de infección por *Leishmania* hacen uso de líneas celulares o cultivos primarios de células tipo macrófagos que simulan el microambiente del parásito dentro del hospedero mamífero, las cuales al ser infectadas experimentalmente con promastigotes de *Leishmania* permiten con ello determinar el potencial citotóxico y leishmanicida del compuesto candidato a medicamento. De allí la importancia de establecer y verificar el tipo de célula mas adecuado que brinde resultados confiables y reproducibles.

Actualmente son varios los métodos *in vitro* que se han desarrollado e implementado con el fin de determinar la sensibilidad de *Leishmania* a drogas. Los diferentes métodos disponibles permiten utilizar cualquiera de los dos estadios del parásito, es decir, promastigotes y amastigotes (tanto axénicos como intracelulares). Sin embargo, la sensibilidad a las drogas ha mostrado ser diferente entre promastigotes y amastigotes⁷, debido a que promastigotes y amastigotes difieren no solo en cuanto a morfología sino también composición bioquímica y metabolismo^{8,9,10}.

Teniendo en cuenta que la sensibilidad de *Leishmania* a las drogas es diferencial según el estadio del parásito y que además, el amastigote intracelular es el estadio biológico clínicamente relevante al ser él la forma del parásito presente en las lesiones de los pacientes, el tamizaje de la actividad leishmanicida debe hacerse idealmente sobre el estadio intracelular del parásito. Adicionalmente, los resultados arrojados en ensayos con amastigotes intracelulares correlacionan mejor con la respuesta terapéutica observada en los pacientes⁵. El sistema adecuado para el tamizaje *in vitro* de compuestos para actividad leishmanicida en amastigotes intracelulares implica la infección inicial de las células (macrófagos) con promastigotes de *Leishmania*. Luego de 3 h post-infección aproximadamente, se logra la transformación de los promastigotes en amastigotes, y se inicia el proceso de supervivencia intracelular y multiplicación al interior de las células con lo que se evidencia el establecimiento de la infección. Una vez se ha establecido la infección (24 h post-infección, aproximadamente) las células infectadas se exponen a la acción de los compuestos a los que se les quiere

determinar su capacidad para dañar los parásitos que están al interior de las células y por ende, reducir o eliminar la carga parasitaria. Este proceso *in vitro* es similar a lo que ocurre en una infección natural cuando el insecto vector inocula los promastigotes, quienes al ingresar a los macrófagos presentes en piel y otros tejidos, se transforman en amastigotes, sobreviven a la respuesta microbicida inducida por el macrófago, logrando así establecer la infección y desarrollar la enfermedad¹¹.

Puesto que el objetivo fundamental de los sistemas *in vitro* es reproducir los procesos que están ocurriendo en un proceso *in vivo*, es necesario asegurar que las condiciones *in vitro* utilizadas para la evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de un compuesto simulen el ambiente al que el parásito está expuesto cuando se encuentra en el hospedero vertebrado y se asegure que los resultados obtenidos representen adecuadamente un punto de partida para la utilización de los compuestos en estudios *in vivo*. Desafortunadamente, los estudios realizados para evaluar la actividad leishmanicida de compuestos, tanto de origen natural como de síntesis química, aunque numerosos, varían considerablemente no solo en relación a las especies de *Leishmania* y los tipos de células empleadas en los sistemas *in vitro* sino también los métodos de evaluación, por lo que los resultados de estos estudios, la mayoría de las veces, no son comparables ni concluyentes. Teniendo en cuenta que los amastigotes son la forma intracelular de el parásito, es importante que la línea celular seleccionada para estos ensayos brinde un ambiente intracelular lo mas similar posible al que tiene el parásito en el huésped mamífero, para poder sobrevivir y replicarse.

Las células más comúnmente empleadas en los sistemas *in vitro* de evaluación para actividad leishmanicida son las U-937 que es una línea celular de monocitos humanos derivados de un linfoma histiocítico¹², la línea celular THP-1 que corresponde a una línea de monocitos humanos derivados de una leucemia linfocítica aguda¹³ y las células J774A.1 que es una línea celular de macrófagos murinos derivados de un sarcoma de células reticulares (aislado en La Jolla CA, 1968). Ocasionalmente los sistemas *in vitro* de evaluación de compuestos para actividad citotóxica y leishmanicida utilizan cultivos primarios de monocitos y macrófagos de sangre periférica de humanos y de macrófagos peritoneales de ratón y hámster, aunque, los resultados presentan una mayor variabilidad en comparación a las líneas celulares, debido a la heterogeneidad de la población inherente al donante de las células.

Se ha demostrado, sin embargo, que cada tipo de macrófago presenta una susceptibilidad diferente a la infección por *Leishmania*. Esto significa que la cantidad de parásitos requeridos por cada célula para lograr el 50% de infección *in vitro* (parámetro que se conoce como Concentración Infecciosa 50 (CI₅₀)) es diferente para cada tipo de macrófago, independiente de si son células de una línea celular o de un cultivo primario. Puesto que la capacidad de un compuesto para eliminar o disminuir la carga parasitaria, es decir, el número de parásitos intracelulares, se determina en células que han sido previamente infectadas, es necesario utilizar el tipo de célula adecuada, es decir, que sea susceptible a la infección *in vitro* por especies de *Leishmania*. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad diferencial a la infección *in vitro* por *L. panamensis* de las células comúnmente empleadas y con ello validar el sistema que permita obtener resultados reproducibles y confiables para su uso futuro en los ensayos para tamizaje *in vitro* de compuestos con actividad anti-*Leishmania*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Para los ensayos de infección *in vitro* se utilizaron promastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* UA140-piReGFP que corresponde a la cepa M/HOM/COL87/UA140 transfectada con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Los parásitos se mantuvieron en cultivo en medio NNN modificado a 26°C hasta alcanzar su fase estacionaria de crecimiento (5 días).

Células

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de promonocitos humanos U-937 (CRL-1593-2TM) y THP-1 (TIB-202TM), las células reticulares de ratones Balb/c J774A.1 (TIB-67TM) y las células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) Vero (CCL-81TM). Todas adquiridas del ATCC (del inglés: American Type Cell Collection) en Estados Unidos. Se usaron además cultivos primarios de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana (MDMhu) y de macrófagos peritoneales de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (MPha). Los procedimientos para la obtención de células de donantes y hámster contaron con el aval institucional del Comité de Ética Humana (CIBH) y del Comité de Ética para la Experimentación con Animales (CEEA) de la Universidad de Antioquia.

a. Obtención de cultivos primarios de MDMhu y MPha

Los MDMhu se obtuvieron a partir de sangre venosa de dos donantes sanos. Para ello, a cada donante se le extrajeron 50 ml de sangre de los cuales 10 ml se usaron para obtener suero autólogo y los 40 ml restantes de sangre se utilizaron para la obtención de monocitos luego de ser desfibrinada con perlas de vidrio¹⁴. La sangre desfibrinada se centrifugó a 500 x g durante 7 minutos, T^oA y el paquete de células se resuspendió en solución de Hank (HBSS), libre de calcio y magnesio, en proporción 1:1. La sangre diluida se centrifugó sobre un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque 1,077 g/L, en una proporción 3:1 (sangre:Ficoll), a 800 x g durante 20 minutos, T^oA. Las células mononucleares así obtenidas se lavaron dos veces con HBSS, centrifugando cada vez 5 minutos a 600 x g y posteriormente a 500 x g. Luego del conteo en cámara de Neubauer las células se ajustaron a una concentración de 1x10⁶ células/mL en medio RPMI-1640 suplementadas con 0,5% de suero autólogo y penicilina- estreptomycin (100 U/mL y 100 mg/mL, respectivamente).

Las células a la correspondiente concentración se depositaron en cada pozo de un plato para cultivo celular de 24 pozos que contenía una lamilla de vidrio. Los platos se incubaron a 37°C. Después de 4 h se hizo cambio de medio con RPMI-1640 suplementados con 10 % de suero autólogo y penicilina estreptomycin; finalmente las células se incubaron durante 72 h a 37°C para permitir su adherencia y transformación en macrófagos. El procedimiento descrito se siguió para las evaluaciones por microscopía óptica. Para las evaluaciones por citometría de flujo las células se ajustaron a una concentración de 3 x 10⁶ células/mL y se depositaron en platos de 24 pozos sin laminillas de vidrio.

Los MPha se obtuvieron a partir de exudado peritoneal de hamsters previamente inoculados intraperitonealmente con tioglicolato al 0,4% y luego del sacrificio de los animales en cámara de CO₂. El exudado peritoneal se depositó en tubos con EDTA. Se lisaron los glóbulos rojos con agua y posterior centrifugación en presencia de cloruro de sodio al 3,6%. Se descartó el sobrenadante y luego del conteo, las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y penicilina-estreptomycin. Las células se ajustaron a una concentración de 0,1 x 10⁶ células/mL y 0,3 x 10⁶ células/mL, para las evaluaciones por microscopía óptica y citometría de flujo, respectivamente. Un mL de la suspensión de células se depositó en cada pozo de un plato para

cultivo celular de 24 pozos que contenía una lamilla de vidrio y los platos se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24 h para favorecer su adherencia y transformación en macrófagos. Para las evaluaciones por citometría de flujo las células se depositaron en platos de 24 pozos sin laminillas de vidrio.

b. Mantenimiento de las líneas celulares

Las células U-937, THP-1, J774A.1 y Vero se mantuvieron en cultivo a una concentración de 0,5 x 10⁶ células/mL medio RPMI-1640 con 10% de SFB y 1% de penicilina-estreptomicina, e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ realizando pases cada 72 h.

Curvas de crecimiento de las líneas celulares

Células en fase exponencial de crecimiento se ajustaron a una concentración de 0,1 x 10⁶ células/mL de medio RPMI-1640 con 10% de SFB. A cada pozo de un plato para cultivo celular de 24 pozos se adiciono 1 ml de células. Los platos se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂. Diariamente y durante 10 días se realizó el conteo del total de células en cada pozo. El conteo se hizo en cámara de Neubauer usando eosina al 0,1% como colorante supra vital. Se usaron dos pozos por cada día de crecimiento.

Preparación de las poblaciones celulares previo a la infección

a. Preparación de las líneas celulares adherentes J774A.1 y Vero

Un día antes de la infección las células Vero y J774A.1 en fase exponencial de crecimiento se ajustaron a una concentración de 0,1 x 10⁶ células/mL para las evaluaciones por microscopía óptica y 0,3 x 10⁶ células/mL para las evaluaciones por citometría de flujo, en medio RPMI-1640 suplementadas con 10% de SFB, y 1% de penicilina-estreptomicina. En cada pozo de un plato para cultivo celular de 24 pozos (conteniendo o no laminilla de vidrio), se adicionó 1 mL de células y se incubaron durante 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ previo a la infección.

b. Preparación de líneas celulares en suspensión U-937 y THP-1

Tres días antes de la infección las células U-937 y THP-1 en fase exponencial se contaron, se ajustaron a una concentración de 0,1 x 10⁶ células/mL para las evaluaciones por microscopía óptica y 0,3 x 10⁶ células/mL para las evaluaciones por citometría de flujo en medio RPMI-1640 suplementadas con 10 % de SFB

y 1% de penicilina-estreptomicina y se les indujo la adherencia mediante la adición de 0,1 µg/mL de Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), en platos para cultivo celular de 24 pozos que contenían o no una laminilla de vidrio (dependiendo si eran evaluadas por microscopía óptica o citometría de flujo). Las células se incubaron durante 72 h a 37 °C, 5% de CO₂ previo a la infección.

c. Preparación de cultivos primarios de MPha y MDMhu

Luego de la obtención de las células (como se describió previamente), las células se incubaron durante 24 o 72 h a 37°C en 5% de CO₂, según se trataran de MPha o MDMhu.

Infección *in vitro* de las células con promastigotes de *L. panamensis*

Cada una de las poblaciones de células se incubaron con promastigotes de *L. panamensis* en fase estacionaria de crecimiento en las siguientes concentraciones 5, 10, 20 y 40 parásitos: célula, resuspendidos en medio RPMI 1640 libre de suero, a 34°C, 5% de CO₂. Luego de 2 h de infección, se retiraron los parásitos libres (no internalizados) mediante dos lavados con medio RPMI-1640. Se adicionó medio nuevo suplementado con 10% de SFB y las células se mantuvieron durante 24 h a 34°C, 5% de CO₂. Cumplido este tiempo, las células se lavaron y se prepararon para la evaluación de la infección tanto por microscopía óptica como por citometría de flujo siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

Evaluación de la infección por *L. panamensis* en las poblaciones de macrófagos

La infección de las células se determinó por microscopía óptica y citometría de flujo según el porcentaje de células infectadas y la carga parasitaria (número de parásitos por cada célula infectada), ambos parámetros determinadas por microscopía óptica y citometría de flujo. Para la evaluación de la infección por citometría de flujo las células se desprendieron del fondo de cada pozo con la ayuda del embolo de una jeringa, se resuspendieron en un mL de solución salina tamponada con fosfatos (PBS) y se transfirieron a un tubo de citometría. Las células en suspensión se leyeron en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500MPL) a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión, contando 10.000 eventos¹⁴. Se determinó el porcentaje de células infectadas según el número de eventos positivos (fluorescencia verde) mediante análisis de diagrama de puntos, al igual que la carga parasitaria según el análisis de la Intensidad

de Fluorescencia Media para el canal de fluorescencia verde^{15,16}. Por su parte, para evaluar la infección por microscopía óptica, las células adheridas a las laminillas de vidrio se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa para su evaluación por microscopía óptica, en donde se hizo conteo al microscopio en objetivo de 100X del número de células infectadas por cada 100 células (% de infección) y del número de amastigotes en cada célula infectada (carga parasitaria).

La CI_{50} se calculó según el dato de la carga parasitaria obtenido en las células infectadas utilizando el programa estadístico Probit, que permite determinar el efecto dosis-respuesta, es decir, la concentración de parásitos versus la carga parasitaria, mediante una regresión binomial de las variables¹⁷. La susceptibilidad de los diferentes tipos de células a la infección por *L. panamensis* se determinó según la CI_{50} obtenida para cada población celular.

Supervivencia de *L. panamensis in vitro*

La supervivencia intracelular de *L. panamensis*, es decir, la capacidad de *L. panamensis* para sobrevivir como amastigote intracelular en las células Vero, J774A.1, U-937, THP-1, MDMhu y MPha se evaluó a las 24 y 72 h post-infección. Para ello, las células (líneas celulares en fase exponencial de crecimiento así como los cultivos primarios) adheridas a laminillas de vidrio se incubaron en presencia de promastigotes de *L. panamensis* en proporción 25:1 parásitos: célula a 34°C y 5% de CO₂ durante 2 h. Los parásitos no internalizados se retiraron lavando dos veces con medio RPMI libre de suero y se adicionó medio fresco suplementado con 10 % de SFB. Posteriormente, las células infectadas se incubaron a 34°C, 5% de CO₂ durante 24 y 72 h adicionales. Cumplido cada uno de estos tiempos las células se lavaron con solución de Hank, se fijaron con paraformaldehído al 4%, y se les adicionó medio de montaje para su evaluación por microscopía de fluorescencia. Las células se evaluaron bajo objetivo de 100X contando el número de células infectadas y la cantidad de amastigotes intracelulares en las células infectadas. Tanto el porcentaje de infección como la carga parasitaria obtenidos a las 24 y 72 h se compararon con los mismos parámetros obtenidos a las 2 h de infección.

Sensibilidad de las poblaciones de macrófagos al antimonio de meglumina y anfotericina B

Las diferentes líneas celulares en fase exponencial de crecimiento así como los cultivos primarios obtenidos se ajustaron a una concentración de 1×10^5 células/

mL para U-937, $0,25 \times 10^6$ células/mL para las THP-1 o $0,5 \times 10^6$ células/mL para Vero, J774A,1 y cultivos primarios. Un mL de cada suspensión de células se dispuso cada pozo de un plato para cultivo celular de 96 pozos en medio RPMI-1640 con 10 % de SFB y la correspondiente concentración de anfotericina B o antimonio de meglumina. Para ambos medicamentos se evaluaron seis concentraciones dobles seriadas a partir de 200 µg/mL para la anfotericina B y 1000 µg/mL para antimonio de meglumina. Luego de las 72 h de incubación en presencia de los medicamentos, el efecto de los compuestos en la viabilidad de las células se determinó midiendo la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial por el método MTT, adicionando 20 µl/pozo de reactivo MTT (5 mg/mL) e incubando a 37°C durante 3 h. La reacción enzimática se detuvo con la adición de 100 µL/pozo de una solución al 50% de isopropanol y 10% de SDS y la incubación durante 30 minutos a T^oA. La producción de Formazán se midió a 570 nm en un lector de ELISA. Células cultivadas en ausencia de los medicamentos pero mantenidas en las mismas condiciones se utilizaron como control de viabilidad. Cada concentración de los medicamentos así como el control sin medicamento fue evaluada por duplicado en dos experimentos diferentes. Los datos obtenidos fueron usados para calcular la Concentración Letal 50 (CL_{50}) calculada por el método Probit¹⁶.

Análisis estadístico

Las diferencias en relación a susceptibilidad de las diferentes células a la infección y la sensibilidad a los medicamentos se compararon mediante un análisis de varianza de una vía ANOVA usando el programa estadístico PRISMA versión 5.0.

RESULTADOS

Cinética del crecimiento de las líneas de macrófagos *in vitro*

El crecimiento de las líneas celulares varió según el tipo de la línea celular, independientemente de si eran células adherentes o células en suspensión. Así por ejemplo, se observó que las células adherentes Vero, J774A,1 y las células en suspensión THP-1 presentaron un crecimiento más lento en comparación con las células U-937. Mientras que en las células Vero, J774A,1 y THP-1 no se observó una fase exponencial de crecimiento, las células U-937 alcanzaron la fase estacionaria alrededor del día 6 en cultivo, evidenciando con ello una fase de

crecimiento exponencial prolongada con un aumento del número de células a medida que aumentan los días en cultivo (**Figura 1**).

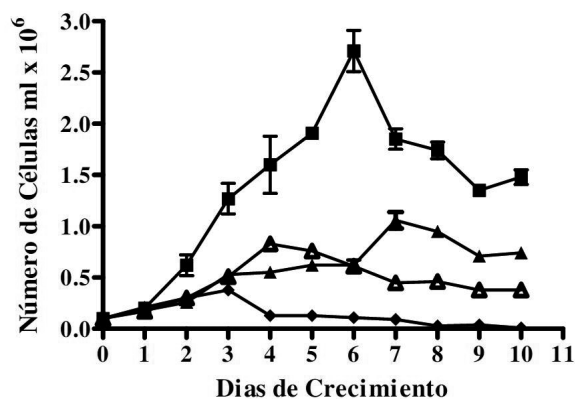


Figura 1. Cinética de crecimiento de líneas celulares de origen humano, murino o primates *in vitro*. U-937 monocitos humanos derivados de un linfoma histiocítico (■); THP-1 monocitos humanos derivados de sangre periférica de un paciente con leucemia aguda (▲); J774A.1: monocitos/macrófagos de origen murino (▼); Vero: células epiteliales de riñón de mono verde africano (◆). Los datos representan el valor promedio \pm la desviación estándar de cada cultivo por duplicado.

Susceptibilidad de las poblaciones de macrófagos a la infección por *L. panamensis in vitro*

Las líneas celulares U-937 y THP-1 presentaron similitudes en la susceptibilidad a la infección obteniendo una CI_{50} de $43,6 \pm 12,1$ y $42,1 \pm 7,2$ (por microscopía óptica) y de $15,2 \pm 1,6$ y $24,0 \pm 1,7$ (citometría de flujo). Similar comportamiento se observó entre los MDMhu y MPha que tuvieron valores de CI_{50} de $39,55 \pm 2,9$ y $35,2 \pm 4,6$ parásitos/célula (por microscopía óptica) y de $15,16 \pm 1,8$ y $13,6 \pm 2,3$ parásitos/célula (por citometría de flujo) (**Tabla 1**). Por su parte, las células Vero mostraron ser las menos susceptibles a la infección por *L. panamensis*, ya que necesitaron en promedio 3-10 veces más parásitos por célula para lograr el 50% de infección. Esta diferencia en la susceptibilidad observada para las células Vero frente

a las demás células fue estadísticamente significativa con valores $P < 0,0001$ y $P = 0,0003$ para microscopía óptica y citometría de flujo, respectivamente.

Tabla 1. Susceptibilidad de líneas celulares y cultivos primarios a la infección *in vitro* por *L. panamensis*.

Célula	Microscopía óptica	Citometría de flujo
U-937	$43,60 \pm 12,1$	$15,20 \pm 1,6$
THP-1	$42,10 \pm 7,2$	$24,00 \pm 1,7$
J774A.1	$22,60 \pm 3,9$	$12,30 \pm 2,6$
Vero	$243,17 \pm 31,7$	$66,20 \pm 12,2$
MPha	$35,20 \pm 4,6$	$13,60 \pm 2,3$
MDMhu	$39,55 \pm 2,9$	$15,16 \pm 1,8$

Los datos corresponden al promedio de la CI_{50} para cada tipo de célula \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes cada uno por duplicado.

Al comparar los métodos de evaluación de la infección se encontró que la citometría de flujo es un método más sensible que la microscopía óptica ya que la CI_{50} determinada por citometría de flujo fue ligeramente menor que la determinada por microscopía óptica.

Supervivencia intracelular de *L. panamensis* en diferentes tipos de macrófagos

Teniendo en cuenta que las diferentes células se infectaron con la misma concentración de parásitos, la supervivencia intracelular de *Leishmania* se evidenció según el aumento en el número de parásitos por célula observado a las 24 y 72 h post-infección, en comparación con el número de parásitos por célula observado a las 2 h post-infección. Así mismo, teniendo en cuenta que los amastigotes intracelulares pueden lisar las células y al liberarse infectar células adyacentes, la supervivencia del parásito también se evidenció según el aumento del porcentaje de células infectadas. Los datos obtenidos por microscopía de fluorescencia indicaron que las células U-937, THP-1 y MDMhu permitieron la multiplicación de los parásitos intracelulares a medida que aumentan las horas post-infección lo que se evidenció por el aumento en el número de parásitos por célula. Es así como para las células U-937 el número de parásitos por célula aumentó de $2,6 \pm 0,4$ a $3,7 \pm 0,1$ y a $5,9 \pm 0,4$ a las 2, 24 y 72 h respectivamente (**Figura 2**).

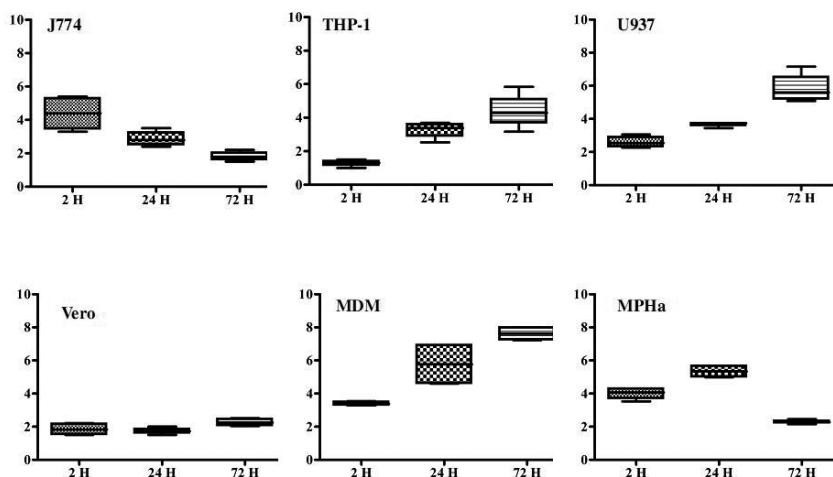


Figura 2. Supervivencia intracelular de *L. panamensis* según tipo de célula hospedera. La figura muestra el promedio de amastigotes por cada célula infectada luego de 2, 24 y 72 h de infección. Los datos corresponden al valor promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes cada uno por duplicado

Para las células THP-1 el número de parásitos por célula fue de $1,3 \pm 0,2$, de $3,2 \pm 0,5$ y de $4,4 \pm 0,9$ a las 2, 24 y 72 h respectivamente. Para los MDMhu el número de parásitos por células a las 2 h fue de $3,4 \pm 0,2$ y aumentó a $5,8 \pm 1,6$ y $7,6 \pm 0,6$ a las 24 y 72 h respectivamente. En las células Vero el aumento solo se observó a las 72 h, cuando el número de parásitos por célula de $1,8 \pm 0,1$ (2 h) y $1,7 \pm 0,2$ (24 h) aumentó a $2,3 \pm 0,1$ a las 72 h. En los MPha aunque el número aumentó de $3,9 \pm 0,3$ (2 h) a $5,7 \pm 0,5$ (24 h), disminuyó a $2,3 \pm 0,1$ a las 72 h. Al contrario de lo observado para las células U-937 y MDMhu, las células J774A.1 mostraron ser las menos permisivas ya que tanto el número de parásitos por célula como el porcentaje de células infectadas disminuyó a medida que aumentaron las horas post-infección (**Figura 2**). Es así como a las 2 h el número de parásitos por célula pasó de de $4,4 \pm 1,3$ (2 h) a $2,9 \pm 0,5$ a las 24 h y a $1,8 \pm 0,3$ a las 72 h.

	2	$26,3 \pm 1,1$
Vero	24	$20,5 \pm 4,9$
	72	$45,0 \pm 2,1$
	2	$5,3 \pm 0,4$
THP-1	24	$42,0 \pm 2,1$
	72	$41,0 \pm 1,4$
	2	$79,0 \pm 1,4$
MPha	24	$73,0 \pm 5,7$
	72	$30,8 \pm 6,7$
	2	$50,5 \pm 1,4$
MDMhu	24	$67,0 \pm 5,7$
	72	$67,0 \pm 4,2$

^a Promedio de células infectadas/ 100 células. Los datos corresponden al promedio de células infectadas \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes cada uno por duplicado.

Tabla 2. Supervivencia intracelular de *L. panamensis* en diferentes tipos de macrófagos

Tipo célula	Tiempo post-infección	% Infección ^a
J774	2	$82,5 \pm 4,2$
	24	$71,5 \pm 10,6$
	72	$31,3 \pm 2,5$
U937	2	$57 \pm 14,8$
	24	$53,8 \pm 6,7$
	72	$78,5 \pm 2,8$

Quando se comparó la supervivencia de los parásitos en relación al número de parásitos por célula infectada se encontraron diferencias significativas en las siguientes condiciones: 2 h: THP-1 vs J774A,1 ($P < 0,001$); THP-1 vs MDMhu y U-937 ($P < 0,01$), Vero vs J774A,1 y MDMhu ($P < 0,01$); MDMhu vs MPha, U-937, J774A.1 y Vero ($P < 0,05$); U-937 vs Vero, J774A,1 y MPha ($P < 0,05$), THP-1 vs Vero ($P < 0,05$) y MPha vs J774A.1 ($P < 0,05$). A las 24 h: Vero vs MDMhu, MPha, U-937 y

J774A,1 ($P < 0,01$) y THP-1 vs MDMhu, MPha, J774A.1 y Vero ($P < 0,05$). A las 72 h: MPha vs MDMhu y U-937 ($P < 0,001$), J774A,1 vs MDMhu y U-937 ($P < 0,001$), U-937 vs THP-1 y Vero ($P < 0,001$), MDMhu vs THP-1 y Vero ($P < 0,01$), Vero vs MPha y J774A,1 ($P < 0,05$) y MDMhu vs U-937 ($P < 0,05$).

El porcentaje de células infectadas a los diferentes tiempos post-infección se resumen en la (Tabla 2). En términos generales, en las células U-937 el porcentaje de células infectadas aumentó en un 20% a las 72 h, respecto a las 2 h. Así mismo, para los MDMhu se observó un aumento del 17,0% en el porcentaje de células infectadas de las 2 a las 24 h, porcentaje que se mantuvo hasta las 72 h de infección (Tabla 2), mientras que en las células J774A,1 el porcentaje de infección disminuyó a las 24 y 72 h. Para las células Vero al igual que en las demás poblaciones de macrófagos, a las 72 h se evidenció un aumento de la infección aunque los valores no alcanzaron el 50% de infección. Para las células THP-1 aunque se evidenció un aumento marcado en el porcentaje de células infectadas entre las 2 y 24 h post-infección (5,3% y 42,0% respectivamente), este porcentaje se mantuvo a las 72 h y al igual que lo observado para las células Vero, el porcentaje de infección nunca alcanzó el 50% de infección. Por su parte, en los MPha se observó una disminución cercana al 50% en la infección entre las 2 y las 72 h.

En relación al porcentaje de células infectadas las diferencias significativas encontradas fueron las siguientes: 2 h: THP-1 vs J774A.1, MDMhu y MPha ($P < 0,05$) y Vero vs J774A,1, MPhu y U-937 ($P < 0,05$). A las 24 h: MDMhu vs Vero, J774A,1 y THP-1 ($P < 0,05$) y MPha vs Vero, J774A,1 y THP-1 ($P < 0,005$). A las 72 h: MDMhu vs J774A,1, Vero y MPha ($P < 0,001$), U-937 vs J774A.1 y MPha ($P < 0,001$), THP-1 vs J774A,1, MDMhu y MPha ($P < 0,01$) y U-937 vs Vero ($P < 0,01$).

Sensibilidad a antimonio de meglumina y anfotericina B

La CL_{50} para el antimonio de meglumina fue $> 1,000 \mu\text{g/mL}$, para las células U-937, THP-1 y Vero. Los MPha, J774A.1 y MDMhu y tuvieron un $aCL_{50} = 444,0 \pm 63,2$; $205,7 \pm 21,8$ y $191,7 \pm 14,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 3). Por su parte la anfotericina B mostró niveles de toxicidad con valores de CL_{50} que variaron entre 5,5 y 160,7 $\mu\text{g/mL}$, siendo las más sensibles las células J774A.1 ($CL_{50} = 5,5 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) y las menos sensibles los MDMhu ($CL_{50} = 160,7 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) (Tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad de líneas celulares y cultivos primarios a los medicamentos de uso estándar para el tratamiento de la leishmaniasis.

Tipo de célula	Anfotericina B	Antimonio de meglumina
U-937	$32,2 \pm 8.1$	$>1000,0 \pm 0$
THP-1	$8,1 \pm 1.1$	$>1000,0 \pm 0$
J774A.1	$5,5 \pm 0.6$	$205,7 \pm 21.8$
Vero	23.4 ± 4.7	$>1000,0 \pm 0$
MPha	$16,9 \pm 4.4$	$444,0 \pm 63.2$
MDMhu	$160,7 \pm 1.3$	$191,7 \pm 14.4$

Los datos corresponden al promedio de la $CL_{50} \pm$ la desviación estándar de dos experimentos independientes cada uno por duplicado.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad a la anfotericina B entre MDMhu vs las demás células ($P < 0,0001$), entre las células U-937 vs las células J774A.1 y THP-1 ($P < 0,001$), entre las células Vero y las células J774A.1 y THP-1 y entre las células U-937 y los MPha ($P < 0,05$). En relación a la sensibilidad al antimonio de meglumina se observaron diferencias significativas entre las células MDMhu y las células MPha, U-937 y THP-1, entre las células MPha y las demás células y entre las células J774A.1 y las células U-937, THP-1 y Vero ($P < 0,0001$).

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la susceptibilidad de las células más comúnmente utilizadas en los ensayos de infección *in vitro* por *Leishmania* spp, y su respectiva sensibilidad a los medicamentos anfotericina B y antimonio de meglumina que son los medicamentos de uso estándar para el tratamiento de la leishmaniasis y con ello poder seleccionar el tipo de célula que brinde el sistema de células más adecuado para los ensayos *in vitro* de evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de un compuesto en particular.

Específicamente se evaluó la susceptibilidad en términos del efecto dosis (concentración de parásitos) – respuesta (porcentaje de infección y carga parasitaria) de cinco tipos de macrófagos: MDMhu, MPha y macrófagos diferenciados de las líneas celulares humanas (U-937, y THP-1) y murinas (J774 A.1) infectados con *L. panamensis*. También se evaluó la susceptibilidad de la línea celular de riñón de mono verde africano Vero,

por ser unas células también ampliamente utilizados en estudios de evaluación de antiparasitarios^{18,19}. Los ensayos realizados permitieron determinar algunas de las características de los diferentes tipos de células durante su crecimiento en cultivo como son su tasa de crecimiento y multiplicación y el tiempo en el cual alcanzan la fase exponencial, los cuales son determinantes en su función como células hospederas para estudios de interacción parásito-célula hospedera.

Los mejores sistemas de infección *in vitro* fueron los cultivos primarios ya que las células conservan las características morfológicas y funcionales de los sistemas *in vivo* garantizando que el ambiente intracelular en el que sobrevivirá y se replicará el amastigotes de *Leishmania*, será similar al que tiene el parásito *in vivo*. En contraste a los MDMhu que fueron susceptibles a la infección por *L. panamensis* y permitieron la supervivencia y multiplicación de los amastigotes durante 72 h, los MPha se observó una disminución cercana al 50 % en la infección entre las 2 y las 72 h, lo que sugiere que estas células aunque son susceptibles de infectarse, no son permisivas a la supervivencia de los parásitos al interior de ellas. Desafortunadamente, los cultivos primarios requieren procedimientos complejos para su obtención, tiempo limitado de crecimiento y un bajo rendimiento, limitando por lo tanto la disponibilidad de células para la evaluación de numerosos compuestos. Adicionalmente, la obtención de células a partir de donantes tanto humanos como animales tienen implicaciones bioéticas que dificultan la disponibilidad de las células en el momento que se requieren y finalmente, hay variables no controladas inherentes al donador, que aumentan la variabilidad de los resultados entre experimentos.

En el sistema *in vitro* utilizado en este trabajo, las células se infectan con una misma concentración de parásitos y las células se exponen a los parásitos durante 2 h para que ocurra la infección. Pasado este tiempo, los parásitos libres (no internalizados) se retiran mediante lavados con medio solo o solución de Hank o PBS. De esta forma, se presume que los parásitos que permanecen a las 24 o 72 h post-infección son producto de la supervivencia y multiplicación de los parásitos que lograron entrar a la célula y transformarse en amastigotes durante las 2 h de cultivo. Teniendo en cuenta que en los sistemas *in vitro* para el tamizaje de compuestos con actividad leishmanicida, las células infectadas se exponen al compuesto candidato durante 72 h, es importante utilizar el modelo de células que no solo se infecten sino además que permitan la multiplicación y supervivencia de los parásitos. De esta forma, el efecto del compuesto se puede evidenciar según

la cantidad de parásitos que permanecen al interior de las células (carga parasitaria) luego de 72 h de exposición al medicamento en comparación con las células infectadas y no expuestas a la acción del medicamento¹⁴.

Teniendo en cuenta los inconvenientes operativos que ofrecen los cultivos primarios, los resultados obtenidos sugieren que las células U-937 son las que permiten la obtención de resultados comparables a los obtenidos con cultivos primarios y por ende son las más indicadas para utilizar en experimentos *in vitro* de infecciones con *Leishmania* spp ya que ésta línea celular presenta un crecimiento exponencial continuo y de fácil manejo en cultivo, es susceptible a la infección por *Leishmania* spp y permiten la multiplicación y supervivencia intracelular de los amastigotes. En contraste, las células THP-1 aunque tienen como ventaja el que son también células de origen humano y permiten la multiplicación y supervivencia de los amastigotes durante 72 h, presentan una tasa de crecimiento lento lo que podrían incidir en la disponibilidad de un número constante y alto de células para los ensayos de tamizaje masivo de compuestos. Adicionalmente, aunque estas células son susceptibles a la infección por *Leishmania* spp, las tasa de infección no alcanzan el 50% aun a las 72 h post-infección. Por su parte, las células J774A.1, aunque comúnmente usada para la realización de los estudios *in vitro* de especies de *Leishmania*^{20,21}, por ser una línea celular que crece en monocapa y de forma indefinida en donde la adherencia al sustrato no detiene su crecimiento, no es posible al final de un experimento asegurar realmente cual es la concentración celular que se tiene y por lo tanto no es posible adicionar la concentración de parásitos que garantice la infección del 50% de la población celular, pues el número de células será mayor al número de parásitos requeridos y por lo tanto los datos de CI_{50} no serán exactos ni reproducibles. Caso contrario a lo que sucede con la línea celular U-937 que por ser histiocitos a los que hay que inducir su diferenciación con PMA que inhibe su capacidad de replicación, nos permite tener la certeza que la población inicial usada para un experimento será la misma al final del experimento. Por último, las células Vero, que aunque no son células fagocíticas y al parecer pueden interactuar con promastigotes de *Leishmania* permitiendo su transformación a amastigotes y su multiplicación intracelular, el número de parásitos requeridos para alcanzar el 50% de infección de la población de células es seis veces más alto en comparación con las células de tipo monocito/macrófago, lo que sugiere la pobre susceptibilidad de esta línea celular a la infección por especies de *Leishmania*.

Al comparar los métodos de evaluación de la infección *in vitro* se encontró que la citometría de flujo, además de ser un método más rápido y de evaluación más objetiva que la microscopía óptica, es un método más sensible y por ello se recomienda como método eficiente para la evaluación de infección *in vitro* por especies de *Leishmania* y detección de la actividad leishmanicida de compuestos, entre otros.

Según las CL_{50} obtenidas por el método MTT para cada tipo de células evaluadas y teniendo en cuenta los criterios establecidos en nuestro laboratorio, en los cuales se considera como a) compuesto muy tóxico aquellos compuestos que presenten $CL_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$, b) compuestos tóxicos aquellos que muestren valores de $CL_{50} > 10$ y $< 100 \mu\text{g/ml}$, c) compuestos medianamente tóxicos los compuestos con valores de $CL_{50} > 100$ y $< 1000 \mu\text{g/ml}$ y d) compuestos potencialmente no tóxicos los compuestos con valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$, los resultados sugieren que el antimonio de meglumina es potencialmente no tóxico para las líneas celulares U-937, THP-1 y Vero pero posee un efecto medianamente tóxico para la línea celular J774A.1 y para los MDMhu y MPha. Por su parte la anfotericina B mostró ser muy tóxico para las células J774A.1, THP-1 y Vero, tóxico para la línea celular U-937 y MPha y medianamente tóxico para los MDMhu.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que las células U-937 por ser susceptibles a la infección por *L. panamensis*, permitir la supervivencia y multiplicación de los parásitos hasta por 72 h, no ser sensibles a la acción del antimonio de meglumina pero si a la acción de la anfotericina B, representan la línea celular más adecuada para reemplazar los cultivos primarios en estudios relacionados con la interacción de *Leishmania* y su célula hospedera y con la evaluación de compuestos para actividad leishmanicida. Adicionalmente, la mayor sensibilidad en la lectura de los resultados ofrecida por la citometría de flujo en comparación con la microscopía óptica brinda una alternativa más confiable, rápida y muy útil en el tamizaje de actividad antiparasitaria de compuestos candidatos a medicamentos.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias y a CIDEPRO por su apoyo financiero. Los autores agradecen a E.M. Cardona, J.A. Tobón, J.D. Murillo y A. Daza por la asistencia técnica en el suministro de promastigotes de *Leishmania* y macrófagos peritoneales de hámster.

ASPECTOS ÉTICOS

Los procedimientos para la obtención de células de donantes y hámster contaron con el aval institucional del Comité de Ética Humana (CIBH) y del Comité de Ética para la Experimentación con Animales (CEEA) de la Universidad de Antioquia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Ninguno de los autores manifiesta tener conflicto de interés con las instituciones financiadoras del estudio o con el lugar donde se realizó el trabajo.

REFERENCIAS

1. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 581-596.
2. Clem A. A current perspective on leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010; 2: 124-126.
3. Robledo SM, Puerta JA, Muñoz DL, Guardo M, Vélez ID. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V) panamensis* en Colombia. *Biomedica* 2006; 26: 188-193.
4. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 309-322.
5. Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol* 1999; 85: 360-366.
6. Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007; 56: 3-7.
7. Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 1999; 180: 564-567
8. Sadick MD, Raff RV. Differences in expression and exposure of promastigote and amastigote membrane molecules in *Leishmania tropica*. *Infect Immun* 1985; 47: 395-400.
9. Glaser TA, Baatz JE, kreishmant PG, Mukkada AJ. pH homeostasis in *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 7602-7606.

10. Keithly JS. Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamsters. *J Euk Microbiol* 2007; 23: 244-245.
11. Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1221-1234.
12. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577.
13. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171-176.
14. Robledo S, Wozencraft A, Valencia AZ, Saravia N. Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility *in vitro* with clinical phenotype. *J Immunol* 1994; 152: 1265-1276.
15. Varela M RE, Muñoz DL, Robledo SM, Kolli BK, Dutta S, Chang KP, Muskus C. *Leishmania (Viannia) panamensis*: an *in vitro* assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp Parasitol* 2009; 122: 134-139.
16. Singh N, Dube A. Fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 400-402.
17. Finney JD. *Probit Analysis* (3rd edition). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1971.
18. Kaur K, Patel SR, Patil P, Jain M, Khan SI, Jacob MR, Ganesan S, Tekwani BL, Jain R. Synthesis, antimalarial, antileishmanial, antimicrobial, cytotoxicity, and methemoglobin (MetHB) formation activities of new 8-quinolinamines. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 915-930.
19. da Silva Filho AA, Resende DO, Fukui MJ, Santos FF, Pauletti PM, Cunha WR, Silva MLA, Gregório LE, Bastos JK, Nanayakkara NPD. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia* 2009; 80: 478-482.
20. Ordóñez-Gutiérrez L, Espada-Fernández R, Dea-Ayuela MA, Torrado JJ, Bolás-Fernandez F, Alunda JM. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 325-329.
21. Bin Dajem SM. *In vitro* evaluation of the efficacy of deferoxamine against *Leishmania* major life cycle stages. *J King Saud Univ - Science* 2010; 22: 67-71.