

ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE UNA LÍNEA CELULAR DE
***Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) A LA INFECCIÓN CON**
Leishmania (L) chagasi, Leishmania (V) braziliensis

CAROLINA MUÑOZ CAMARGO

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

Biólogo

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE UNA LÍNEA CELULAR DE
Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) A LA INFECCIÓN CON
Leishmania (L) chagasi, *Leishmania (V) braziliensis***

CAROLINA MUÑOZ CAMARGO

APROBADO

**Felio J. Bello García, M.Sc
Director**

**Alfonso Barreto, M.Sc
Codirector**

**Hugo Diez O, M.Sc
Jurado**

**Giovanny Fagua G, M.Sc
Jurado**

**ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE UNA LÍNEA CELULAR DE
Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) A LA INFECCIÓN CON
*Leishmania (L) chagasi, Leishmania (V) braziliensis***

CAROLINA MUÑOZ CAMARGO

APROBADO

Angela Umaña Muñoz, Ph.D
Decano Académico

Cecilia Espíndola, M.Sc
Directora de Carrera

Este documento se firma, sin perjuicio de los acuerdos que el autor(es) pacte con la Unidad Académica referentes al uso de la obra o a los derechos de propiedad industrial que puedan surgir de la actividad académica.

Carolina Muñoz C. 52715.720

FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTOR

Apellidos	Nombres
Muñoz Camargo	Carolina

DIRECTOR

Apellidos	Nombres
Bellos García	Felio de Jesús

ASESOR

Apellidos	Nombres
Barreto Prieto	Alfonso

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Bióloga

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE UNA LÍNEA CELULAR DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) A LA INFECCIÓN CON *Leishmania* (L) *chagasi*, *Leishmania* (V) *braziliensis*

SUBTÍTULO DEL TRABAJO:

Infección de un cultivo celular con *Leishmania*

FACULTAD: Ciencias Básicas

PROGRAMA: Carrera Especialización ____ Maestría ____ Doctorado

NOMBRE DEL PROGRAMA: Biología

CIUDAD: BOGOTA **AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO:** 2005

NÚMERO DE PÁGINAS: 101

TIPO DE ILUSTRACIONES:

Ilustraciones

Mapas X

Retratos

Tablas X

gráficos y diagramas X

Planos

Láminas

Fotografías X

MATERIAL ANEXO (Vídeo, audio, multimedia o producción electrónica):

Duración del audiovisual: _____ Minutos.

Número de casetes de vídeo: _____ Formato: VHS ___ Beta Max ___ ³/₄
___ Beta Cam _____

Mini DV ___ DV Cam ___ DVC Pro ___ Vídeo 8 ___ Hi 8 _____

Otro. Cual? _____

Sistema: Americano NTSC _____ Europeo PAL _____ SECAM _____

Número de casetes de audio: _____

Número de archivos dentro del CD (En caso de incluirse un CD-ROM
diferente al trabajo de grado:

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES:

Cultivo celular, *Leishmania*, morfometría, porcentaje de infección.

RESUMEN DEL CONTENIDO

Para evaluar la susceptibilidad de un cultivo celular derivado de tejido embrionario de *Aedes aegypti* a la infección con *Leishmania chagasi* (leishmaniosis visceral) y *Leishmania braziliensis* (leishmaniosis cutánea y mucocutánea), se seleccionaron células de *Aedes aegypti* mantenidas en una mezcla de medio de cultivo Grace/L15, suplementado con suero fetal bovino al 15%, albendazol 5,4 µg/ml y una mezcla de antibiótico y

antimicótico al 1% e incubadas a una temperatura promedio de 26°C. Se ubicaron en cajas de 24 pozos, en las cuales se fijaron previamente laminillas de 12 mm de diámetro. Luego de 24 horas fueron inoculadas con promastigotes metacíclicos de la cepa MH/CO/84/CI-044B de *L. chagasi* y la cepa HOM/BR752903 de *L. braziliensis* en una concentración de diez parásitos por célula.

La susceptibilidad se evaluó en términos de porcentajes de infección y número de amastigotes intracelulares. Las células, además, fueron examinadas en un estudio morfométrico, utilizando el software analizador de imágenes (Image Proplus) para cuantificar el incremento del área celular de las células infectadas comparado con las no infectadas. Encontrando así, que las células de *Ae. aegypti* infectadas mostraron cambios en el área por la influencia de los parásitos; contrario a lo registrado en las células no infectadas ($P < 0.05$).

Se demostró la interacción entre las células de tejido embrionario del insecto con las dos especies de *Leishmania*, comprobado a través de la observación de vacuolas parasitóforas con formas amastigotas del parásito en porcentajes relativamente altos de infectividad, comparado con el control positivo J774.

Los datos anteriores indican que los cultivos celulares de *Ae. aegypti* no vector de *L. chagasi* y *L. braziliensis*, se infecta con estos protozoos y por lo tanto puede ser propuesto en el futuro como un modelo alternativo para el mantenimiento y desarrollo del ciclo biológico de estas dos especies de parásitos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue posible gracias a la financiación de Colciencias y la Universidad de la Salle.

Al Doctor Felio Bello, por acogerme en su laboratorio y por colaboración para sacar este trabajo adelante.

A Alfonso Barreto por la revisión, corrección y aportes a este proyecto.

A Concepción Puerta por los comentarios y sugerencias recibidas para el desarrollo de esta investigación.

A Jaime Castellanos del laboratorio de virología de la Universidad del Bosque, a Alexandra Segura de la Universidad Nuestra Señora del Rosario y a Carlos Rodríguez Biólogo de la Universidad Javeriana, por la asesoría y colaboración recibida en la parte estadística y de análisis de datos, aportada al trabajo.

A Leonor Caldas y Ladys Sarmiento del departamento de Análisis y Procesamiento de Imágenes por el desarrollo de la técnica de Microscopia electrónica.

A Cristina Zapata, Jesús Escovar, Víctor Acero, Johana Mejía, William Serrano y Alfonso Miranda por la colaboración, entrenamiento enseñanzas y amistad aportada para la realización de esta investigación.

A los demás compañeros del laboratorio de Entomología, Biología celular y Genética: Jorge Peña y Gilberto Torres.

A Raúl Rodríguez Biólogo de la Fundación Instituto Inmunológico por facilitarme soporte bibliográfico para sustentar los resultados de este proyecto.

A Daniel Franco y Sandra Escudero por su amistad, revisión y corrección del Abstract.

Especialmente quiero agradecer a Amanda Moreno, Jennifer Londoño y Olga Osorio por su apoyo y revisión del escrito de este trabajo.

A Don Day, por que sin su apoyo jamás hubiera llegado hasta aquí.

Por último a mi mamá y mi hermano por ser mis guías y un apoyo incondicional en mi vida.

23 de Mayo del 2005

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Cultivos celulares	3
2.1.2 Tipos de cultivos celulares	4
2.1.3 Biología de la célula en cultivo	5
2.1.4 Líneas celulares de insectos	6
2.2 Importancia de <i>Aedes aegypti</i>	9
2.3 <i>Leishmania</i> y leishmaniosis	10
2.3.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	10
2.3.2 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Leishmania</i>	14
2.4 Distribución geográfica del parásito	18
2.4.1 Situación en Colombia	19
2.4.2 Leishmaniosis tegumentaria	24
2.4.3 Leishmaniosis visceral	25
2.4.4 Diagnostico	26
2.4.5 Tratamiento y resistencia	29
2.5 Morfométria celular	30
3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	32
3.1 Formulación del problema	32
3.2 Justificación	32
3.3 Hipótesis	33
4 Objetivos	33
4.1 Objetivo general	33
4.2 Objetivos específicos	33

5 MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Mantenimiento de los cultivos celulares y de los parásitos	34
5.1.1 Cultivos de <i>Aedes aegypti</i>	34
5.1.2 Cultivos de macrófagos (J774)	36
5.1.3 Parásitos	37
5.2 Criopreservación de las células de <i>Ae aegypti</i>	38
5.3 Infección celular	39
5.4 Microscopia electrónica	41
5.5 Morfometría celular	41
5.6 Análisis estadístico	42
6 RESULTADOS	43
6.1 Comportamiento celular	43
6.2 Criopreservación de células de <i>Aedes aegypti</i>	43
6.3 Infección celular	43
6.3.1 Porcentaje de infección celular	46
6.3.2 Promedio de los porcentajes de infección y amastigotes por célula de los Cultivos celulares	50
6.3.3 Observaciones con microscopia electrónica de transmisión	52
6.4 Morfometría de las células de <i>Aedes aegypti</i>	54
6.4.1 Observación de los cambios morfológicos	54
6.5 DISCUSIÓN	56
6.5.1 Comportamiento celular	56
6.5.2 Infección celular	58
6.5.3 Microscopia electrónica de transmisión	66
6.5.4 Morfometría celular	68
7 CONCLUSIONES	70
8 RECOMENDACIONES	71
9 LITERATURA CITADA	72
10 ANEXOS	86

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Filogenia del Género <i>Leishmania</i>	10
Tabla 2. Clasificación del género <i>Leishmania</i> basada en isoenzimas taxonomía numérica	14
Tabla 3. Frecuencia de casos y tasas x 100.000 habitantes de leishmaniosis cutánea en los departamentos más afectados de Colombia	20
Tabla 4. Tasa de personas con leishmaniosis visceral x 100.000 habitantes en los departamentos más afectados de Colombia	20
Tabla 5. Técnicas para Identificar los parásitos de <i>Leishmania</i>	26
Tabla 6. Promedios del porcentaje de infección y número de amastigotes por célula de <i>Ae. aegypti</i> y J774 con <i>L. braziliensis</i> Y <i>L. chagasi</i>	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estadios morfológicos de <i>Leishmania</i>	11
Figura 2. Ciclo de vida digenético de <i>Leishmania</i>	12
Figura 3. Mapa de distribución global de <i>Leishmania</i>	18
Figura 4. Mapa de distribución del riesgo de leishmaniosis visceral en Colombia por municipio en el 2003	21
Figura 5. Mapa de distribución del riesgo de Leishmaniosis cutánea en Colombia por municipio 2003	22
Figura 6. Caso de un niño con leishmaniosis visceral	25
Figura 7. Medidas de área, eje mayor y eje menor de una célula de la línea celular LULO	30
Figura 8. Monocapa del cultivo celular de <i>Ae. aegypti</i>	34
Figura 9. Monocapa de la línea celular de macrófagos J774	36
Figura 10. <i>L. braziliensis</i> y <i>L. chagasi</i> en medio NNN	37
Figura 11. Caja de 24 pozos	39
Figura 12. Infección celular de <i>Ae. aegypti</i> con <i>L. chagasi</i> MH/CO/84/CI-044B	44
Figura 13. Infección celular del cultivo <i>Ae. aegypti</i> con <i>L. braziliensis</i> HOM/ BR752903	45
Figura 14. Porcentaje promedio de infección de los cultivos de <i>Aedes aegypti</i> y J774 inoculados con <i>L. chagasi</i> y <i>L. braziliensis</i> en los días post-infección indicados.	48
Figura 15. Porcentaje promedio de infección de los cultivos celulares infectados con <i>L. chagasi</i> y <i>L. braziliensis</i>	50
Figura 16. Promedio de amastigotes por célula en los cultivos celulares infectados con <i>L. chagasi</i> y <i>L. braziliensis</i>	

(pool de datos de las células infectadas en los 3,6 y 9 días post-infección)	51
Figura 17. a) Célula de <i>Ae. Aegypti</i> con material organelar característico (flechas) 12000X.b) Célula de <i>Ae. Aegypti</i> con una vacuola parasitofora (flecha) 24000X barra= 1.0 μm	52
Figura 18. a) Célula J774 infectada con un parásito intravacuolar. 12600X barra=1.5 μm . b) Célula J774 infectada con numerosas Vacuolas. 12600X barra= 1.5 μm	53
Figura 19. Frecuencia de células de <i>Ae. aegypti</i> en los rangos de área y días post-infección indicados.	55
Figura 20. a) Células de <i>Ae. aegypti</i> pre-infección. b) Células de <i>Ae. aegypti</i> infectadas con <i>L. chagasi</i> y c) <i>L.braziliensis</i>	56

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. L15Componentes del medio de Cultivo Grace	86
ANEXO 2. Componentes del Medio de Cultivo	87
ANEXO 3. Componentes del medio de cultivo RPMI	88
ANEXO 4. Composición del medio de cultivo NNN para <i>Leishmania</i> sp.	89
ANEXO 5. Composición del medio de cultivo Schneider's	90
ANEXO 6. Kruskal Wallis para la infección de <i>Ae. aegypti</i> / <i>L. Braziliensis</i> comparado con los días 3, 6 y 9	91
ANEXO 7. Kruskal Wallis para la infección de J774 / <i>L. Braziliensis</i> comparado con los días 3, 6 y 9	92
ANEXO 8. Kruskal Wallis para la infección de <i>Ae. aegypti</i> / <i>L. chagasi</i> comparado con los días 3, 6 y 9	93
ANEXO 9. Kruskal Wallis para la infección de J774 / <i>L. chagasi</i> comparado con los días 3, 6 y 9	94
ANEXO 10. Valor P de la prueba U (Mann Wihitney) para los cultivos infectados con <i>L. braziliensis</i> y <i>L. chagasi</i>	95
ANEXO 11. Promedio del porcentaje de infección de las células de <i>Ae. Aegypti</i> con <i>L. braziliensis</i> en los días indicados	95
ANEXO 12. Promedio del porcentaje de infección en las células de J774 con <i>L. braziliensis</i> en los días indicados	96
ANEXO 13. Promedio del porcentaje de infección de las de <i>Ae. Aegypti</i> con <i>L. chagasi</i> en los días evaluados	96
ANEXO 14. Promedio del porcentaje de infección en las células J774 con <i>L. chagasi</i> en los días evaluados	97
ANEXO 15. Promedio del número de amastigotes	

de <i>L. braziliensis</i> por célula, observados e el cultivo de <i>Ae. aegypti</i> en los días post-infección indicados	97
ANEXO 16. Promedio del número de amastigotes de <i>L. braziliensis</i> por célula, observados en la línea celular J774 en los días post-infección indicados	98
ANEXO 17. Promedio de amastigotes de <i>L. chagasi</i> por célula observados en el cultivo de <i>Ae. aegypti</i> en los días post-infección indicados	98
ANEXO 18. Promedio de amastigotes de <i>L. chagasi</i> por célula observados en la línea celular J774 en los día post- infección	99
ANEXO 19. Prueba Kruskal Wallis para el análisis morfométrico de las células de <i>Ae. aegypti</i> no infectadas y las células infectadas con <i>L. chagasi</i> y <i>L. braziliensis</i> en los días 3, 6 y 9 post-infección.	100
ANEXO 20. Prueba U de Mann Whitney para la comparación entre célula de <i>Ae. aegypti</i> no infectada y las infectadas con <i>L. chagasi</i> y <i>L. braziliensis</i>	100
ANEXO 21. Histograma de frecuencia de las células de <i>Ae. aegypti</i> no infectadas y las infectadas con <i>L. chagasi</i> y <i>L. braziliensis</i>	101

RESUMEN

Para evaluar la susceptibilidad de un cultivo celular derivado de tejido embrionario de *Aedes aegypti* a la infección con *Leishmania chagasi* (leishmaniosis visceral) y *Leishmania braziliensis* (leishmaniosis cutánea y mucocutánea), se seleccionaron células de *Aedes aegypti* mantenidas en una mezcla de medio de cultivo Grace/L15, suplementado con suero fetal bovino al 15%, albendazol 5,4 µg/ml y una mezcla de antibiótico y antimicótico al 1% e incubadas a una temperatura promedio de 26°C. Se ubicaron en cajas de 24 pozos, en las cuales se fijaron previamente laminillas de 12 mm de diámetro. Luego de 24 horas fueron inoculadas con promastigotes metacíclicos de la cepa MH/CO/84/CI-044B de *L. chagasi* y la cepa HOM/BR752903 de *L. braziliensis* en una concentración de diez parásitos por célula.

La susceptibilidad se evaluó en términos de porcentajes de infección y número de amastigotes intracelulares. Las células, además, fueron examinadas en un estudio morfométrico, utilizando el software analizador de imágenes (Image Proplus) para cuantificar el incremento del área celular de las células infectadas comparado con las no infectadas. Encontrando así, que las células de *Ae. aegypti* infectadas mostraron cambios en el área por la influencia de los parásitos; contrario a lo registrado en las células no infectadas ($P < 0.05$).

Se demostró la interacción entre las células de tejido embrionario del insecto con las dos especies de *Leishmania*, comprobado a través de la observación de vacuolas parasitóforas con formas amastigotas del parásito en porcentajes relativamente altos de infectividad, comparado con el control positivo J774.

Los datos anteriores indican que los cultivos celulares de *Ae. aegypti* no vector de *L. chagasi* y *L. braziliensis*, se infecta con estos protozoos y por

lo tanto puede ser propuesto en el futuro como un modelo alternativo para el mantenimiento y desarrollo del ciclo biológico de estas dos especies de parásitos.

Palabras clave: cultivo celular, *Leishmania*, morfometría, porcentaje de infección.

ABSTRACT

To evaluate the susceptibility of a cell culture derived of embryonic tissue from *Aedes aegypti* to the infection with *Leishmania chagasi* (visceral leishmaniosis) and *Leishmania braziliensis* (cutaneous leishmaniosis and mucocutaneous), the cells of *Aedes aegypti* were contained in boxes of 24 wells, previously stuck to round glass coverslips of 12 mm of diameter and maintained in culture medium Grace/L15, supplement with bovine fetal serum to 15%, albendazol 5,4 mg/ml and an antibiotic mixture and antimicotic to 1% and incubated to a temperature average of 26°C, they were inoculated with metacyclic promastigotes of the strain MH/CO/84/CI-044B of *L. chagasi* and the strain HOM/BR752903 of *L. braziliensis* in a concentration of ten parasites for cell.

The susceptibility was evaluated in terms of infection percentages and number of amastigotes intracellular. The cells were also examined in a morphometrics study, using the analyzing software Image Proplus (Medya cybernetics) to quantify the increment of the cellular area of the infected cells compared with those non infected.

The interaction was demonstrated among the cells of embryonic tissue of this insect non vector with the two species of *Leishmania*, evidenced through the observation of parasitophorous vacuole with amastigotas forms of the parasite in relatively high infection percentages, compared with the positive control J774.

Infected cells of *Ae. aegypti* showed changes in the area for the influence of the parasites that differ significantly ($P < 0.05$) compared with the not infected cells.

These data indicates that the cellular cultures of the mosquito *Ae. aegypti* non vector of *L. chagasi* and *L. braziliensis*, are infected with these protozoas and therefore it can be proposed in the future as an alternative

model for the maintenance and development of the biological cycle of these two species of parasites.

Key words: cell culture, *Leishmania*, morphometrics, infection percentage.

1. INTRODUCCIÓN

Las líneas celulares de invertebrados han sido cultivadas exitosamente durante los últimos 35 años y tradicionalmente se han utilizado para estudiar agentes infecciosos que representan un riesgo en el campo de la salud pública y la agricultura. Algunos de los más estudiados son los arbovirus, los baculovirus, y la relación de éstos con sus insectos vectores. Sin embargo, en la actualidad la utilidad de los cultivos celulares se ha extendido a diferentes campos de la biología entre las cuales se destacan las áreas de genética, bioquímica, biología molecular y parasitología entre otras (Morales *et al.* 1997).

Se ha considerado que la utilización de cultivos celulares de mosquitos vectores de enfermedades, es una herramienta útil en el estudio de unas de las parasitemias más frecuentes en los países del trópico como lo son las leishmaniosis, Zoonosis y en algunos casos antroponosis que afectan la piel (leishmaniosis cutánea localizada o difusa), las mucosas o las vísceras (Kala-azar); que resultan del parasitismo de los macrófagos por protozoos de diferentes especies del género *Leishmania* introducido al organismo por la picadura de un insecto de la familia *Phlebotomidae* (Anónimo, 1995).

La complejidad de estas patologías radica en que pueden ser producidas por varias especies de *Leishmania* y a su vez una especie del parásito puede producir las diferentes formas clínicas por factores desconocidos tanto del huésped como del parásito (Anónimo, 1994)).

Por otro lado, la distribución de esta parasitemia está ligada a la distribución geográfica de los insectos vectores de la familia *Phlebotomidae*, de la cual las especies del género *Phlebotomus* son las

que transmiten los agentes etiológicos de la leishmaniosis en Europa, África y Asia; y las especies del género *Lutzomia* en América (Anónimo, 1996).

En América, el agente etiológico de la leishmaniosis visceral es el parásito de la especie *Leishmania* (L) *chagasi* cuyo vector primario es el flebótomo *Lutzomia longipalpis*, mientras que uno de los agentes etiológicos de la leishmaniosis cutánea es *Leishmania* (V) *braziliensis* transmitida por *Lutzomia spinicrassa* y otras especies de flebótomos (Muskus y Marin-Villa 2002, Silva *et al.* 2002).

Las leishmaniosis se encuentran distribuidas en Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia, siendo endémica en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países. Este conjunto de enfermedades ocupa el sexto lugar ubicándose dentro de las enfermedades tropicales más graves del mundo (Anónimo, 1996).

En Colombia se reporta como endémica en aproximadamente el 50% del territorio. Por esta razón, se han realizado estudios enfocados en las características biológicas de insectos vectores de diferentes patologías que afectan a la salud pública. De los cuales se destaca, el establecimiento de colonias y el desarrollo de cultivos celulares caracterizados morfológica, citogenética, bioquímica y molecularmente, como el caso de los cultivos de *Aedes aegypti* (Ardila, 2005). Este mosquito es importante en salud pública, debido a que es uno de los modelos mejor caracterizados y se considera el vector primario del virus del dengue y potencial transmisor del agente etiológico de la fiebre amarilla, siendo esta una de las enfermedades de mayor incidencia en países tropicales y subtropicales en vía de desarrollo (Sardelis *et al.* 2000).

Con este trabajo se evidenció que existe una interacción, internalización y maduración *in vitro* de las dos especies de protozoos *L. chagasi* y *L. braziliensis* con las células *Ae. aegypti*, mosquito no vector natural de estos agentes etiológicos de la leishmaniosis. Proponiendo hacia el futuro,

estás células como un modelo *in vitro* alternativo para el estudio de eventos en la interacciones que ocurren entre parásitos del género *Leishmania* y sus insectos vectores.

2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivos celulares

Los cultivos celulares provenientes de vertebrados se empezaron a desarrollar a finales del siglo XIX, como una forma de reproducir *in vitro* las condiciones celulares naturales de un tejido, libre de las variaciones que se producen *in vivo* en el animal (metabolismo, crecimiento celular, etc.) (Vago, 1971).

Históricamente, los cultivos celulares de invertebrados se han venido desarrollando paralelo a los de vertebrados. Conjuntamente al trabajo de Ross Harrison en 1907, en el que realizó los primeros intentos por desarrollar un cultivo celular para aislar nervios de rana, Richard Goldschmidt en el mismo laboratorio examinaba el desarrollo del gusano de seda en cultivos de prueba (Lynn, 1999). El mayor éxito para la técnica de cultivos celulares de animales se presentó entre los años 1950s y 60s y se le atribuyó, en parte, a la disponibilidad de antibióticos para mantener los cultivos en asepsia y a los buenos conocimientos bioquímicos que se empezaban a obtener en ese momento. De esta manera se desarrollaron los primeros cultivos celulares en vertebrados (Lynn, 1999; Lynn, 2001).

Otro hecho que permitió el desarrollo de cultivos celulares *in vitro* fue el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955) con los requerimientos nutricionales necesarios para el mantenimiento de las células en cultivo. Posterior a esto el establecimiento de líneas celulares capaces de producir anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975), y el

requerimiento de diferentes mezclas de hormonas y factores de crecimiento (Sato *et al.*, 1984) prolongaron la longevidad de las células en cultivos *in vitro*, permitiendo el desarrollo de estudios que en el pasado eran imposibles de realizar.

2.1.2 Tipos de cultivos celulares

De acuerdo con lo anterior se podría hablar de tres tipos de cultivos:

a. **Cultivo de órganos.** Implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica (Cooper, 2000). Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad (Reina, 2003).

b. **Explantes primarios.** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante (Reina, 2003).

c. **Cultivo celular primario.** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones (Reina, 2003). Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.

Los también denominados cultivos primarios poseen características especiales que los diferencian de las líneas celulares como el hecho de conservar la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto (Burleson *et al.*, 1995; Masters 2000).

2.1.3 Biología de la célula en cultivo

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y de esta forma se aíslan de un órgano determinado o de células que han sufrido modificación (Burleson *et al.*, 1995; Davis, 1996; Masters, 2000). De acuerdo con esa capacidad, las células pueden crecer formando monocapa o en suspensión, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa. Igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, como por ejemplo las células HeLa, células transformadas derivadas de cultivos en monocapa (Davis, 1996).

El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son dependientes de anclaje, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras (Cooper, 2000). El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión. A pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células indiferenciadas (Cooper, 2000; Reina, 2003).

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección:

- a) aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento.
- b) En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a las otras células del cultivo.

Así pues se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos (Reina, 2003).

2.1.4 Líneas celulares de insectos

El cultivo *in vitro* de las más de 500 líneas celulares continuas de insectos que existen actualmente, se logró gracias a la evolución de los medios de cultivo. Los cuales empezaron por ser medios muy simples, que no aseguraban la permanencia de las células por más de tres semanas, hasta aquellos en los cuales se implementó el uso de antibióticos (1950-1960). Posteriormente Grace, estableció la primera línea celular de un insecto utilizando los ovarios de la polilla emperador Australiana (Vago, 1971; Lynn 1999).

Desde entonces se han establecido líneas celulares de diferentes invertebrados, a partir de tejido embrionario, de hemocitos, larvas de neonatos y de diferentes tejidos de insectos adultos (Lynn, 2001); las cuales, en su mayoría hasta hace algunos años, eran utilizadas para aislar e identificar virus; seguida de producción de antígenos, interacción con parásitos, para estudios de fisiología celular, bioquímica y más

recientemente para estudios de biología molecular (Oelofsen *et al.*, 1990; Lynn, 1999; Rey *et al.*, 2000).

Luego del establecimiento de la primera línea celular por Grace en 1962, se inició exitosamente el desarrollo de diferentes líneas celulares de insectos. Kitamura (1965) obtuvo desarrollo *in vitro* de células de tejidos de ovario de *Culex pipiens molestus*; posteriormente, Peleg (1965) describió algunas condiciones para los medios de cultivo, que consideró óptimas para el desarrollo de tejidos de insectos *in vitro*; de igual forma, se evaluó la susceptibilidad de algunos de estos cultivos celulares a la infección con arbovirus.

En 1966, Grace establece exitosamente un cultivo *in vitro* de células de *Ae. aegypti*, seguido por Singh (1967) que reportó una línea celular derivada de larvas de primer estadio de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*; y Peleg (1968) quien obtuvo una línea celular derivada de tejidos embrionarios del mismo insecto.

En 1973 Igarashi reportó diferencias en la habilidad del virus de la encefalitis japonesa para replicarse en las líneas celulares de *Ae. aegypti* establecidas por Singh y Peleg.

Por otro lado, Varma y Pudney (1969) reportaron un método fácil y rápido de subcultivos celulares utilizando tripsina para remover las monocapas celulares, en cultivos de *Ae. aegypti*.

Tesh (1980) estableció por primera vez dos líneas celulares de *Toxorhynchites amboinensis* a partir de tejidos embrionarios y larvas, y evaluó la susceptibilidad de éstas a diferentes arbovirus, concluyendo que no había diferencias en la susceptibilidad a los arbovirus estudiados, comparado con lo reportado en otras líneas celulares de insectos. En 1983 el mismo autor estableció una nueva línea celular a partir de huevos del flebótomo *Lu. longipalpis* (LL-5) y su susceptibilidad a la infección con 29 arbovirus, de los cuales 13 se replicaron en las células LL-5,

sorprendiendo el hecho de que los virus transmitidos comúnmente por flebótomos no se replicaron en las células LL-5 (Tesh y Modi, 1983).

Charpentier *et al.* (1995) desarrollaron y caracterizaron tres líneas celulares de *Ae. triseriatus* derivadas de tejido embrionario y larvas neonatas con el fin de utilizarlas para aislamiento de arbovirus de especies de mosquitos de temperaturas bajas.

Se han realizado pocos estudios acerca de la interacción líneas celulares de insectos con parásitos; por ejemplo, Dedet y Odette (1977), obtuvieron formas amastigotas de *L. donovani* en una línea celular de crecimiento continuo del mosquito *Ae. albopictus* para reemplazar los cultivos axénicos. Fampa *et al.* (2003) realizaron un estudio pionero en el análisis ultraestructural de la interacción entre tejidos de insectos y diferentes tripanosomátidos.

En Colombia Bello *et al.* (1994, 1996) obtuvieron cultivos primarios y líneas celulares, correspondientes a mosquitos y flebótomos de interés en salud pública. Dentro de los cuales se encuentran: *Anopheles albimanus* (Bello *et al.* 1996), *Lu. longipalpis* (Bello, *et al.*, 1996; Rey *et al.*, 2000), *Psorophora confinis* (Bello *et al.*, 1999, 2001), *Lu. spinicrassa* (Zapata, 2004) y *Ae. aegypti* (Ardila, 2005) las cuales fueron caracterizadas morfológica, citogenética y bioquímicamente.

Todos estos estudios, conducen a un mayor conocimiento y la importancia de la interacción entre el hospedero y el patógeno. Sin embargo, muchos de los procesos que involucran las células del vector y los patógenos son desconocidos y por lo tanto interfieren con el manejo y control de estas enfermedades que en países como Colombia representan un problema de salud pública. Por esta razón, es necesario evaluar nuevas líneas celulares, donde se pueden desarrollar diversas investigaciones aplicadas con los parásitos.

2.2 Importancia de *Aedes aegypti*

Los mosquitos de la familia Culicidae son los principales vectores de enfermedades infecciosas graves como el paludismo humano y aviario, el dengue, la fiebre amarilla, la elefantiasis y formas de filariasis (Noble y Noble, 1995; Blair *et al.*, 2000), la importancia médica de esta familia de insectos ha sido profundamente estudiada, ampliando el conocimiento de la epidemiología de estas enfermedades (Zieler *et al.*, 2000).

El mosquito *Ae. aegypti* es una de las especies mejor caracterizadas genéticamente y vector primario en el Nuevo Mundo de los virus del dengue, un potencial transmisor del virus de la fiebre amarilla urbana y del parásito causal de la malaria en las aves *Plasmodium gallinaceum* (Severson *et al.*, 1995) y para el cual se han venido desarrollando estudios en Colombia, del ciclo de vida (ecología) (Tinker *et al.*, 1993; Olano *et al.*, 1993) y aislamiento de arbovirus de la hemolinfa de éste (Morales *et al.*, 1973; Morales *et al.*, 1981).

Ardila *et al.* (2005) estableció y caracterizó, citogenética, morfológica, molecular y bioquímicamente cultivos celulares de tejidos embrionarios del mosquito *Ae. Aegypti*, los cuales se disponen en el laboratorio de Entomología, Biología celular y Genética de la Universidad de la Salle, para realizar estudios de caracterización de antígenos, evaluar susceptibilidad a diferentes arbovirus, actividad celular, flujo intracelular, ecología celular, aplicaciones diagnósticas, aplicaciones médicas, ingeniería de proteínas etc.

2.3 *Leishmania* y Leishmaniosis

2.3.1 Ciclo de vida de *Leishmania*

El parásito *Leishmania* es un protozoo digenético de la familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania* (Tabla 1). En su ciclo de vida adopta dos formas de vida diferentes: amastigote y promastigote (Rivas y López, 1993; Noble y Noble, 1995).

Tabla 1. Filogenia del género *Leishmania*. Fuente González *et al.* 2004

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Filo:	Sarcomastigophora
Subfilo:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophorea
Orden:	Kinetoplastida
Suborden:	Trypanosomatina
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<i>Leishmania</i>

Los amastigotes son formas inmóviles redondas que miden entre 1,5 y 5 μm de diámetro (fig. 1). No se distinguen flagelos al microscopio de luz aunque en el microscopio electrónico se observa un flagelo rudimentario. Están provistos de un núcleo central y un cinetoplasto (Molyneux *et al.*, 1987) estructuras fácilmente observadas al microscopio de luz empleando la coloración de Wright o de Giemsa (Muskus y Marín-Villa, 2002). El citoplasma se tiñe de color azul claro, el núcleo de púrpura y el cinetoplasto en forma de barra se observa de color púrpura o morado más intenso. Las formas amastigotas se encuentran dentro de los macrófagos de los hospederos vertebrados (hombre o animales reservorio) donde se dividen por fisión binaria para finalmente romper la célula parasitada y liberar nuevos amastigotes que a su vez infectan

otros macrófagos en los cuales se repite el proceso (Uribarren, 2004) (fig 2).

Por otro lado, los promastigotes son fusiformes (fig. 1), poseen un núcleo central, un cinetoplasto terminal o subterminal y un largo flagelo que les permite movilizarse. Estas formas se encuentran en el intestino del insecto vector y miden entre 10 a 12 μm de longitud por 3 μm de ancho (Molyneux *et al.*, 1987; Uribarren, 2004). Son transmitidas por vectores flebótomos, clasificados dentro del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomia* en las Américas (Muskus y Marin-Villa, 2002; Vásquez 2002). Estos protozoos son agentes causantes de patologías parasíticas en países tropicales y subtropicales, y dependiendo de la especie del parásito y de las características del hospedero (Noble y Noble, 1995; Courret *et al.*, 2002; Vásquez, 2002).

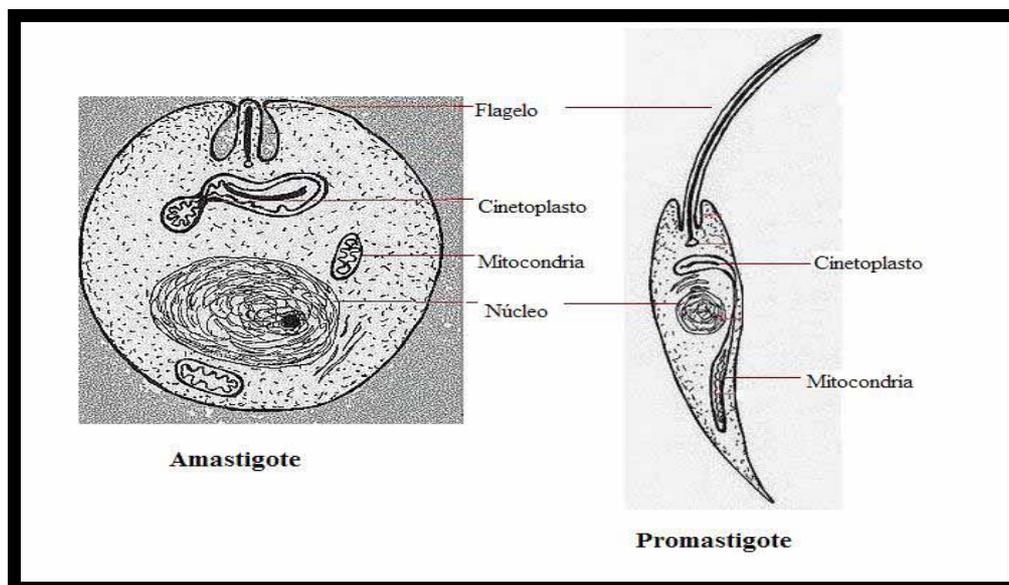


Figura 1. Estadios morfológicos de *Leishmania*. La forma intracelular llamada amastigote, es pequeña con un núcleo céntrico y ovalado, el cinetoplasto, la mitocondria y remanente del flagelo. La forma promastigota que se encuentra en el vector es más grande y posee un flagelo que le permite migrar al tubo digestivo del mosquito para infectar a los huéspedes. Fuente Murray *et al.* 1999

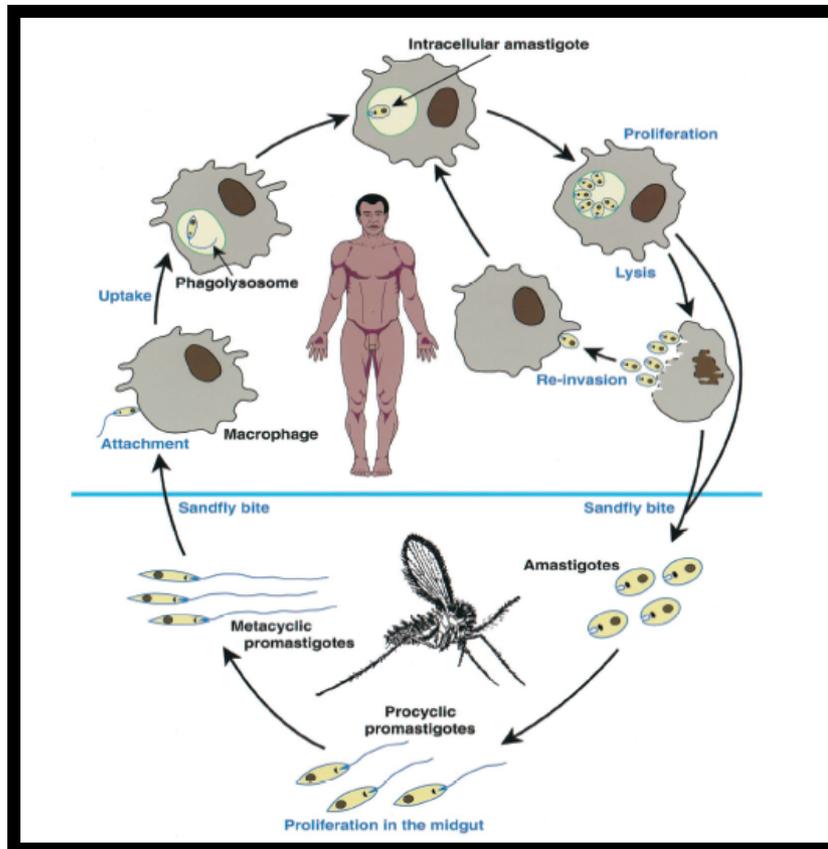


Figura 2. Ciclo de vida digenético de *Leishmania*. Fuente Handman, 2001

Las formas promastigotas metacíclicas tienden a ser más pequeñas, delgadas y con flagelo más largo, presentan alta movilidad y migran hacia la parte anterior del tracto digestivo del vector ubicándose a la altura de la probóscide, listos para ser inoculados en una nueva ingestión de sangre (Bate, 1994).

Además de los cambios morfológicos, el proceso de metaciclogénesis está relacionado con la síntesis de moléculas expresadas exclusiva o diferencialmente en el promastigote infeccioso. Las moléculas mejor estudiadas, caracterizadas y asociadas con la metaciclogénesis son los lipofosfoglicanos (LPG) y la glicoproteína gp63, expresadas abundantemente en la superficie de los promastigotes, los cuales sufren

una notable disminución en el estadio de amastigote (Jacobson, 1995; Muskus y Marín-Villa, 2002).

El género de *Leishmania* se divide en dos subgéneros de acuerdo con el sitio donde se desarrollan en el intestino del vector. En el subgénero *Leishmania* se clasifican las especies que se desarrollan en el intestino medio de los flebótomos y en el subgénero *Viannia* se incluyen las especies que se desarrollan en el intestino posterior a la altura del triángulo pilórico (Anónimo, 1995; Vásquez 2002).

Estos subgéneros a su vez, están divididos en complejos, el subgénero *Leishmania* agrupa los complejos, *L. donovani* cuyas especies son los agentes causales de leishmaniosis visceral o Kala-azar; las especies del complejo *L. tropica* relacionadas con leishmaniosis cutánea; el complejo *L. major* y el complejo *L. aethiopica* implicados en leishmaniosis cutánea y por último las especies del complejo *L. mexicana* involucradas con leishmaniosis cutánea (Handman, 2001).

El subgénero *Viannia* se agrupa en dos complejos: el complejo *L. braziliensis* (*L. braziliensis* y *L. peruviana*) relacionado con la leishmaniosis cutánea y mucocutánea; y el complejo *L. guyanensis* (*L. guyanensis* y *L. panamensis*) cuyas especies provocan lesiones cutáneas y mucocutáneas (Altamirano, 2000) (Tabla 2).

Tabla. 2 Clasificación del género *Leishmania* basada en isoenzimas taxonomía numérica. Fuente Chan-Bacab y Peña Rodríguez, 2001.

Sub Género	Especie	
Leishmania	L. donovani	L. mexicana (Syn. L. pifanoi)
	L. archibaldi	L. amazonensis (Syn. L. garnhami)
	L. infantum-L. chagasi	L. aristidesi
	L. tropica	L. enrietti
	L. killicki	L. hertigi
	L. major	L. deanei
	L. gerbilli	L. turanica*
	L. arabica	L. venezuelensis*
Vianna	L. aethiopica	
	L. braziliensis	L. lainsoni
	L. peruviana	L. naifi
	L. guyanensis	L. colombiensis*
	L. panamensis	L. equatoriensis*
	L. shawi	

*Especies sometidas a reclasificación

2.3.2 Cultivos *in vitro* de *Leishmania*

Existen diferentes medios de cultivo disponibles para el cultivo *in vitro* de promastigotes de *Leishmania*. El medio NNN (medio bifásico, a base de sangre y agar –bacto) fue uno de los primeros medios que se desarrollaron para cultivar parásitos de *Leishmania*. Aun, hoy en día se utiliza este medio, con algunas modificaciones de la fórmula original, estas principalmente reemplazando el agar–bacto, por agares ricos en nutrientes como agar McConnel, agar de infusión de cerebro corazón, adición de varios extractos de tejidos, azúcares y amino ácidos (Jaffe *et al.*, 1983).

Dentro de las ventajas que presenta este medio es que la mayoría de las especies, incluyendo miembros del complejo *L. braziliensis* y *L. donovani* se desarrollan bien en él (Jaffe *et al.*, 1983).

Por otro lado, el medio de cultivo Eagle (medio mínimo esencial) que originalmente se utilizaba para cultivos de células de mamíferos y células de insectos, también, se utilizó para el desarrollo *in vitro* de promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*. Éste medio se utilizaba especialmente para que grandes cantidades de parásitos se desarrollen y puedan ser fácilmente colectados por centrifugación, para análisis bioquímicos e inmunológicos, libres de glóbulos rojos (Jaffe *et al.*, 1983).

El medio de cultivo para células de insecto (Schneider's, Grace) se utilizan para cultivos de promastigotes de *Leishmania*. Estos medios son iguales o superiores a los de mamíferos. Hendricks *et al.* (1978) lograron aislar once especies de *Leishmania* en Schneider's incluyendo miembros del complejo *L. donovani* y *L. braziliensis*.

Un aspecto relevante para los cultivos *in vitro*, es el paso de los parásitos de *Leishmania* por animales de experimentación (hamsters y ratones). Éste procedimiento se debe hacer por dos razones importantes. La primera, un número suficiente de aislados primarios, especialmente en algunas especies difíciles de cultivar y mantener *in vitro*. La segunda, debido a que los promastigotes constantemente repicados *in vitro* pueden perder su virulencia (Jaffe *et al.*, 1983).

Durante el desarrollo del parásito en el tracto digestivo del vector se han descrito varias morfologías. Estos cambios morfológicos, han mostrado asociación con cambios genéticos y bioquímicos, que modulan en algunos casos procesos biológicos (Muskus y Marin-Villa, 2002).

Esta serie de cambios desencadenan la transformación de promastigotes no infectivos o poco infectivos (procíclicos) en promastigotes infectivos (metacíclicos) en el insecto vector, lo que les permite vivir en el ambiente

del hospedero, Proceso que se conoce como metacicloogénesis, el cual también se ha demostrado que ocurre en cultivos axénicos en diferentes especies de *Leishmania* (Muskus y Marin-Villa, 2002). Como por ejemplo Saar *et al.* (1998), quienes desarrollaron un nuevo método *in vitro*, lograron la diferenciación de promastigotes de *L. donovani* en amastigotes, combinando condiciones de temperatura y pH en un medio axénico.

Una de las características del crecimiento de los promastigotes de *Leishmania* tanto *in vitro* como en el vector es que presentan dos fases, una replicativa o logarítmica donde el número de parásitos aumenta y una fase estacionaria donde el número de promastigotes permanece constante (Sacks y Perkins, 1984, Sacks y Kamhawai, 2001). En 1984, Sacks y Perkins empleando macrófagos peritoneales murinos, informaron que la infectividad de los promastigotes de *L. major* obtenidos en la fase estacionaria era mayor que los obtenidos en la fase logarítmica.

Según, Zilberstein y Shapira (1994), los cambios extremos de temperatura tanto en el vector como en la célula hospedera constituyen un factor estresante para los parásitos de *Leishmania*; sin embargo para sobrevivir en estos dos ambientes han adquirido un mecanismo de termotolerancia, que es especie-específico. Es decir, en el vector los parásitos experimentan temperaturas de 22 a 28°C y en la transmisión al hospedero mamífero están expuestos a temperaturas de 31 a 35°C en lesiones cutáneas y hasta 37 en lesiones viscerales (Janovy y Poorman, 1969).

En la literatura (Jaffe *et al.*, 1983) existen varios reportes de cultivos *in vitro* de amastigotes intracelulares en macrófagos. Por ejemplo, en células de sarcoma de perro, células vero, monocitos humanos de sangre periférica y macrófagos peritoneales de hamster y ratón (Nacy y Diggs, 1981), sin embargo, la multiplicación de los amastigotes se ve limitada al número de macrófagos.

Madeira *et al.* (1999) utilizaron macrófagos peritoneales caninos *in vitro* para un estudio de infección con tres especies de *Leishmania*, en el cual concluyeron que las células peritoneales caninas podían ser utilizadas en estudios de patogénesis de *Leishmania* y drogas leishmanicidas. Por su parte, Nacy y Diggs (1981); quienes compararon la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales, en monocapa y suspensión, infectados con *L. major*, reportaron que el número de amastigotes intracelulares aumentó a partir de las 144 horas post-infección, contrario a lo que ocurrió con el porcentaje de células infectadas que disminuyó significativamente a las 192 horas post-infección, tanto en los macrófagos en monocapa, como en suspensión. Sin embargo, concluyeron que los cultivos en suspensión permitieron una mejor cuantificación de la infección.

Dedet *et al.*, 1983; Bogdan *et al.*, 2000; Scout y Hunter, 2002, son algunos de los autores que reportaron que los macrófagos son el principal blanco en la infección con promastigotes tanto *in vivo* como *in vitro*, más no son un tipo celular exclusivo, debido a que se ha reportado infección en células fibroblásticas, epiteliales, neutrofilos y dendríticas (Ghosh y Bandyopadhyay, 2004; Engwerda *et al.*, 2004; Zuluaga y Robledo, 2004).

Por otro lado, en estudios de resistencia a drogas realizados por Sereno y Lemesre (1997) se evaluó por primera vez la respuesta de tres especies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. infantum*) a 7 drogas en un cultivo axénico de formas amastigotas de las diferentes especies de parásitos, estos autores concluyeron que los cultivos evaluados constituyen una herramienta útil para el aislamiento de nuevos componentes con una alta actividad contra la viabilidad de las formas amastigotas.

2.4 Distribución geográfica del parásito

Las leishmaniosis han sido registradas en aproximadamente 88 países del mundo, calculándose que ocurren anualmente alrededor de 12 millones de casos y que existen aproximadamente 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad. La mayoría de los países afectados se encuentran ubicados en áreas del trópico y subtrópico como: México, Centroamérica y Suramérica; desde el Norte Argentina hasta el Sur de Texas (excluyendo a Uruguay, Chile y Canadá), en el Sur de Europa, Asia, en el Medio Oriente y en África (Desjeux, 2004) (fig. 4).

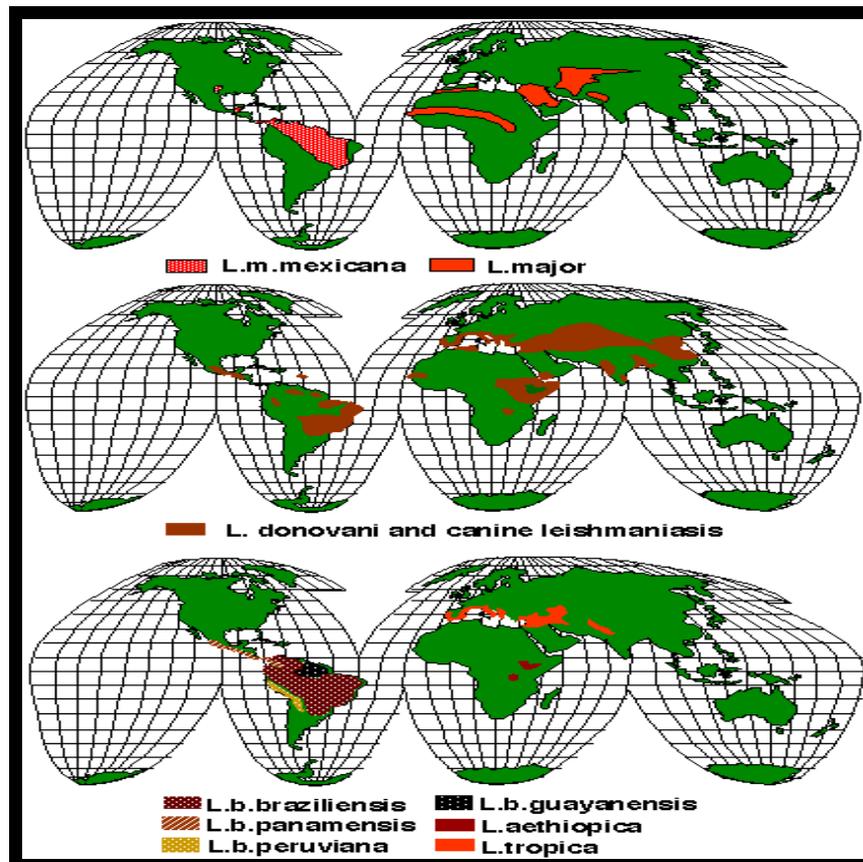


Figura 3. Mapa de distribución global de *Leishmania*. Fuente Cristian De Duve, 2003. Institute of Cellular Pathology Université Catholique de Louvain.

2.4.1 Situación en Colombia

En Colombia, se describió por primera vez la leishmaniosis visceral en 1944 por Gast Galvis en el departamento de Santander. Después de la notificación pasaron 20 años hasta que se reportaron nuevamente dos casos. Desde 1981 se el número de casos aumento notablemente, lo cual se puede explicar por diferentes aspectos tales como: la suspensión de la fumigación de los focos sinantropicos con DDT (Dicloro-Difenil-tricloroetano) y implemento de los métodos de diagnostico de la enfermedad (Corredor *et al.*, 1999).

El comportamiento de la morbilidad por leishmaniosis en Colombia durante los últimos diez años ha mostrado una tendencia ascendente; por ejemplo, en la década de los noventa se presentó un promedio anual de 6500 casos. Los siguientes datos fueron reportados por el Ministerio de Protección Social (2004).

- **1990** – 4.293 casos (40.27 x cada 100mil habitantes)
- **1999** – 6.063 casos (58.56 x cada 100mil habitantes)
- **2002** – 5.650 casos y para el mismo año la unidad sanitaria de las fuerzas militares reportó 472 casos que no están incluidos en los reportes del sivigila para un total de 6.122 casos para dicho año.
- **2003** – 9.708 casos y si se incluyen datos pendientes, se esperan aproximadamente 13.000 casos.
- **2004** – 3.163 casos reportados sólo por la unidad sanitaria de las fuerzas militares.

Según el Ministerio de Salud (2001), entre los años 1.994-1.998, se reportaron en promedio alrededor de 6.500 casos nuevos de Leishmaniosis en Colombia, considerándose como una patología endémica en casi todo el territorio, excepto en San Andrés Islas, Atlántico y Santa fe de Bogotá. Se estima que en el país existen alrededor de 10 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad, siendo la transmisión principalmente rural. De las tres formas clínicas de la patología, se presenta con mayor frecuencia de la cutánea (95% de los casos). La Leishmaniosis visceral es endémica principalmente en el Valle del Río Magdalena y sus afluentes, existiendo focos sinantrópicos bien estudiados en el Tolima, Huila, Cundinamarca, Bolívar, Córdoba y Sucre (Tablas 3 y 4) (Fig. 4 y 5).

Tabla 3. Frecuencia de casos de leishmaniosis cutánea en los departamentos más afectados de Colombia. Fuente: Anónimo, 2001. Instituto Nacional de Salud. SIVIGILA.

Leishmaniosis 2001			
Departamento	Población total 2001	Frecuencia de casos	Tasa x 100.000hab
Cesar	961.535	63	6.55
Córdoba	1.322.852	152	11.41
Meta	700.506	50	7.13
Antioquia	5.377.854	523	9.7
Risaralda	944.296	165	17.47
Boyacá	1.385.110	150	10.98
Tolima	1.296.942	121	9.32
Caquetá	418.998	132	31.5
Total	42'299.301	2774	6.55

Tabla 4. Tasa de personas con leishmaniosis visceral x 100.000 habitantes en los departamentos más afectados de Colombia. Fuente: Anónimo, 2004 Instituto Nacional de salud. SIVIGILA.

Municipios afectados con tasas de Leishmaniasis VISCERAL más altas		
BOYACA	CHITARAQUE	2.27 X 1000 HAB
CHOCO	SAN JOSE DEL PALMAR	1.72 X 1000 HAB
SUCRE	OVEJAS	1.25 X 1000 HAB
ANTIOQUIA	SABANALARGA	1.17 X 1000 HAB

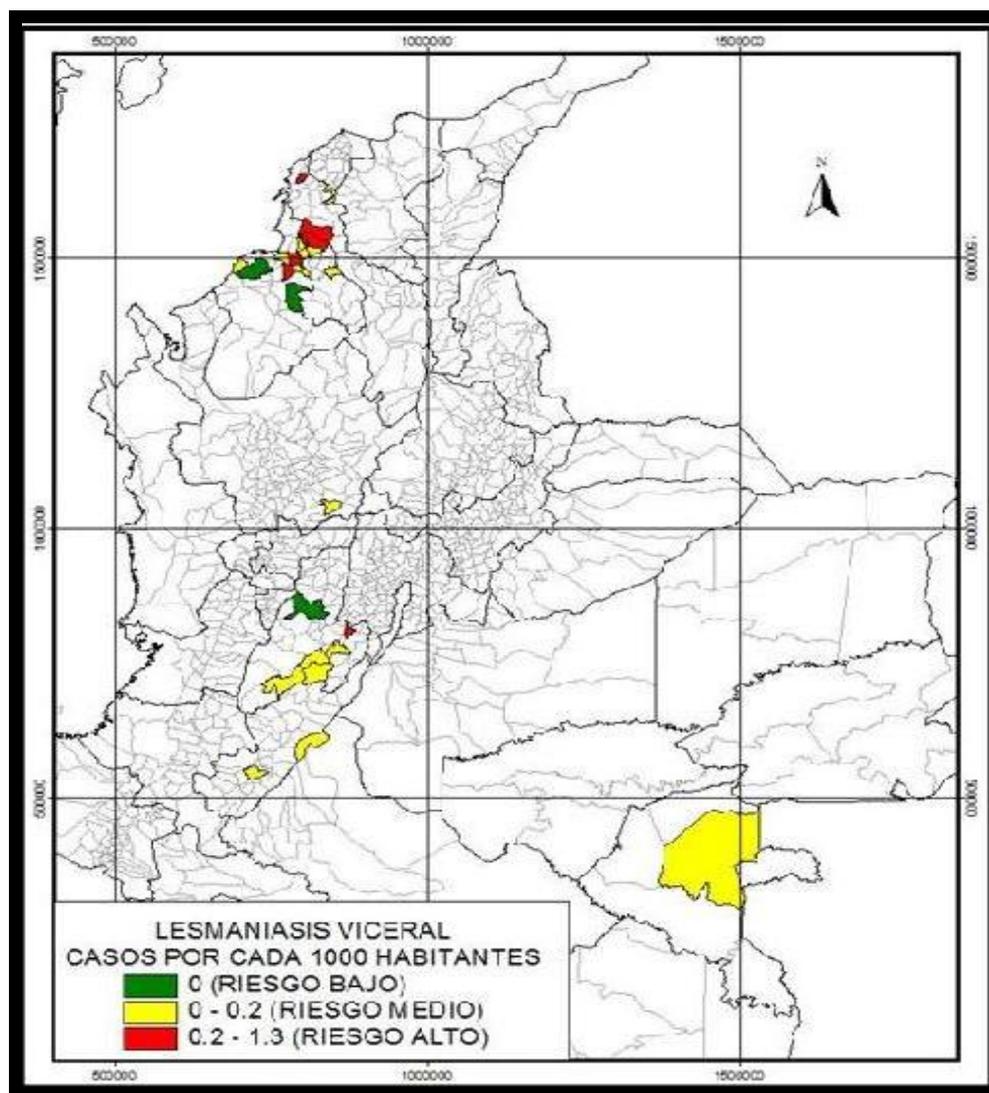


Figura 4. Mapa de distribución del riesgo de leishmaniasis visceral en Colombia por municipio en el 2003. La tasa de incidencia fue de 6 municipios clasificados como de muy alto riesgo, 6 municipios en alto

riesgo, 6 municipios de riesgo medio y 7 municipios en riesgo bajo.
Fuente Anónimo, 2004. Sivigila.

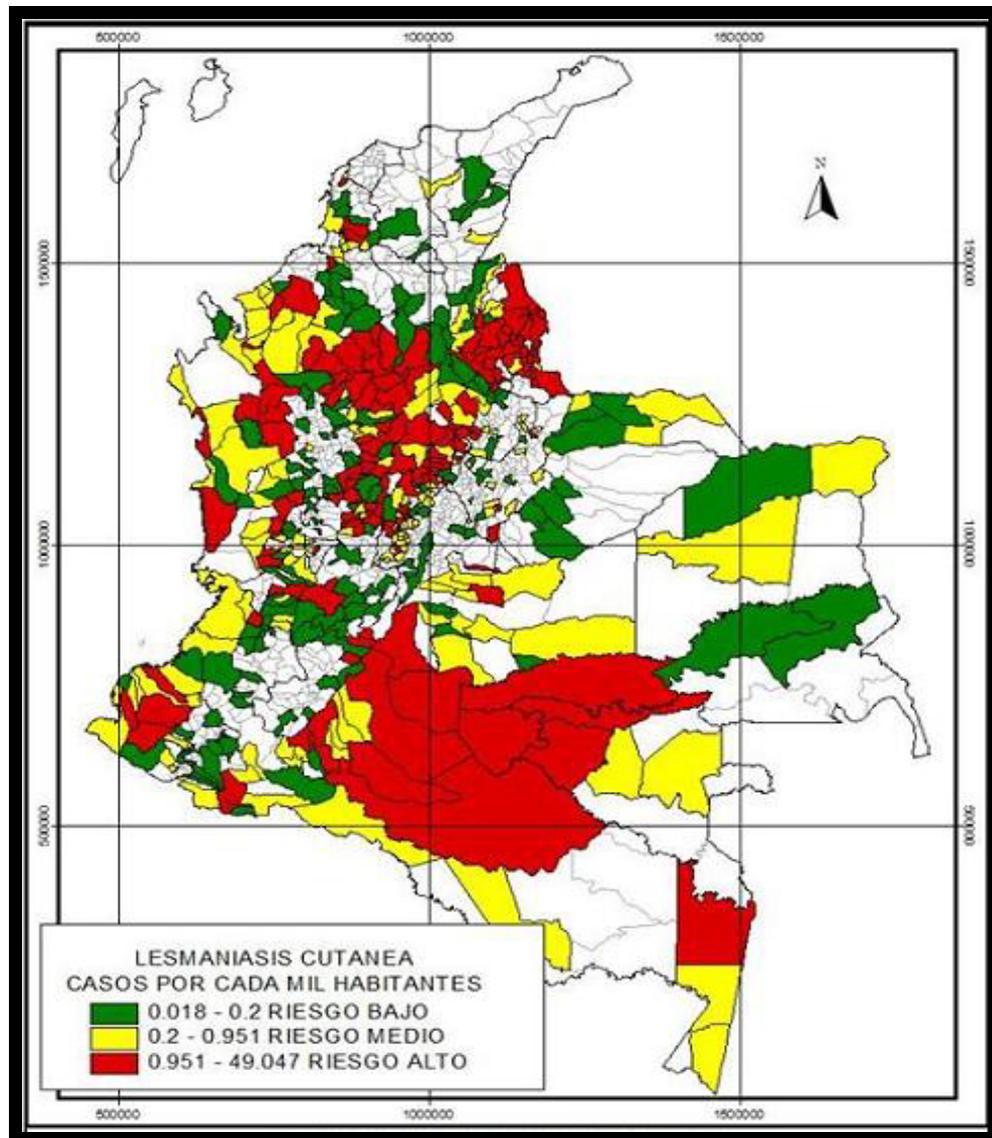


Figura 5. Mapa de distribución del riesgo de Leishmaniasis cutánea en Colombia por municipio 2003. Para la tasa de incidencia de Leishmaniasis cutánea 117 municipios quedaron clasificados como de muy alto riesgo, riesgo alto 116 municipios, riesgo medio 115 municipios y riesgo bajo 123 municipios. Fuente: Anónimo, 2004. Sivigila.

En Colombia, el territorio situado por debajo de los 1.750 m.s.n.m., con clima cálido, humedad relativa adecuada, temperatura media entre 25 y

30°C, presenta las condiciones geoecológicas adecuadas para la transmisión de la enfermedad y la proliferación de focos. El ser humano se infecta cuando penetra en áreas eco-epidemiológicas favorables como bosques tropicales primarios, con abundancia de reservorios y vectores; en bosques secundarios, con selva húmeda tropical, y en bosques secos tropicales. Para el año 2001 se reportó una alta tasa de incidencia de leishmaniosis cutánea en los departamentos de Risaralda, Boyacá, Caquetá, Tolima y Putumayo; y para leishmaniosis visceral la mayor tasa de incidencia fue en el departamento de Córdoba (Silva *et al.*, 2002).

Las especies de *Leishmania* que han sido identificadas en Colombia junto con su distribución geográfica son (Corredor *et al.*, 1990):

L. panamensis se ha encontrado principalmente en la región centro-occidental pero también en la región oriental. Es la especie que ha sido más frecuentemente aislada e identificada en el país, principalmente en casos de leishmaniosis cutánea aunque también en algunos casos de leishmaniosis mucosa.

L. braziliensis ha sido aislada tanto de pacientes con leishmaniosis cutánea como mucosa. Aunque no tan frecuente como *L. panamensis*, tiene también distribución geográfica amplia, más común en la región central y oriental.

También, se han encontrado *L. guyanensis* en la región sur-oriental del país, *L. mexicana* en el departamento de Nariño, *L. colombiensis* en Santander y *L. amazonensis* en los llanos orientales. Las tres primeras especies han sido aisladas de pacientes con leishmaniosis cutánea y la última de un paciente con leishmaniosis difusa.

De igual forma *L. chagasi* ha sido aislada e identificada a partir de casos humanos de leishmaniosis visceral, de vectores (*Lu. Longipalpis* y *Lu. evansi*) y de animales reservorios (perro y zarigüeya) presentes en los focos naturales de transmisión (Anónimo, 1995). Corredor *et al.* (1999)

quienes realizaron un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia de *L. chagasi*, la relación con reservorios, vectores y factores de riesgo en el municipio de Coyaima (Tolima), concluyendo que el principal factor de riesgo es la condición socio-económica precaria.

2.4.2 Leishmaniosis tegumentaria

Las características más sobresalientes de las áreas o focos de transmisión de la enfermedad y las situaciones que conducen a la infección del hombre es posible resumirlas en los siguientes aspectos, teniendo presente que cada foco debe considerarse a su vez específico e individual en su comportamiento clínico, epidemiológico, ecológico y vectorial (Anónimo, 2001).

a) zonas de bosques tropicales primario, generalmente muy extensos, en las cuales no hay asentamientos humanos establecidos y donde permanentemente se encuentran los animales reservorios y los vectores, con ciclos de transmisión continuos.

El hombre se infecta cuando ingresa a estas zonas para realizar actividades relacionadas con la ocupación o labor productiva (tala, caza, pesca, turismo, investigación).

b) Zonas enzoóticas en las cuales se adelantan proyectos de desarrollo económico como apertura de nuevos caminos o carreteras de penetración, explotaciones petroleras y mineras, explotación forestal, construcción de represas, en las cuales se establecen asentamientos humanos y donde el hombre está expuesto a adquirir la infección.

c) Zonas enzoóticas con procesos migratorios y donde el hombre inicia la colonización para ejercer actividades agrícolas, pecuarias, explotaciones madereras, produciendo modificaciones importantes como la deforestación y el reemplazo de animales silvestres por domésticos.

d) Zonas de áreas rurales en las cuales se desarrollan esencialmente actividades pecuarias o agrícolas, principalmente el cultivo de café en donde se da las condiciones esenciales para la transmisión de la enfermedad.

e) zonas urbanas con asentamientos humanos antiguos y estables, alrededor de las cuales se anexan barrios de formación reciente que generalmente limitan o irrumpen en zonas de bosques primarios existentes en la localidad.

2.4.3 Leishmaniosis visceral

L. chagasi, especie que actualmente se clasifica como *L. infantum*, es la causante de la leishmaniosis visceral en América. Se ha encontrado en Venezuela, Brasil, México, Colombia, Bolivia, Argentina, Guatemala, El Salvador y Paraguay. Afecta más a los niños que a los adultos, principalmente en las zonas rurales localizadas a menos de 800 metros sobre el nivel del mar (Anónimo, 2004) (Fig.7)



Figura 6. Caso de un niño con leishmaniosis visceral. Fuente: Anónimo. 1996. OPS.

Las áreas de transmisión de leishmaniosis visceral corresponden a bosque seco tropical que se caracteriza por presentar piso calido, vegetación escasa, baja precipitación pluvial (áreas xerofíticas) y

abundantes rocas. Generalmente la topografía del terreno está constituida por valles estrechos. La mayoría de los casos corresponden a áreas deprimidas con limitado desarrollo social y económico debido a la poca productividad de la tierra (Anónimo. 2001).

En Colombia la distribución geográfica de la enfermedad es consistente con la distribución de *Lu. longipalpis*. Los focos más importantes conocidos hasta ahora se encuentran localizados en el valle alto del departamento de Bolívar, Sucre, Córdoba. Además recientemente se describió a *Lu. evansi* como vector de leishmaniosis visceral en San Andrés de Sotavento (Córdoba), siendo esta la primera vez que se describe un vector de *L. chagasi* diferente de *Lu. Longipalpis* (Montoya-Lerma *et al.*, 1998; Sierra *et al.*, 2000).

2.4.4 Diagnostico

Métodos directos de demostración del parásito

Tabla 5. Técnicas para Identificar los parásitos de *Leishmania*. Fuente: González, 2004.

Métodos directos	Métodos directos
<ul style="list-style-type: none"> • Tinción con Giemsa: frotis por aposición o por escarificado • Histopatología • Cultivo • Inoculación en animales de experimentación 	<ul style="list-style-type: none"> • PCR • Fluorescencia directa con anticuerpos monoclonales • Inmunoperoxidasa • Hibridación en nitrocelulosa • Técnicas de inmunodiagnóstico • Intradermorreacción de Montenegro.

Tinción del parásito: consiste en la visualización del parásito de muestras obtenidas de pacientes, bien sea de material de biopsia en frotis por aposición o por escarificado de la misma. Estas muestras se colorean con Giemsa y los amastigotes de *Leishmania* son observados en el interior de los macrófagos o fuera de estos. El parásito también puede observarse en cortes histológicos, encontrándose más fácilmente en las

formas difusas. La sensibilidad de éstos métodos ha sido reportada entre 32.7 a 90.4% para frotis por aposición y/o escarificado (González, 2004).

El estudio histopatológico presenta una sensibilidad limitada para observar *Leishmania* debido a los cambios que sufre la misma durante el proceso de fijación de las muestras con formol; sin embargo, la característica formación de un granuloma ante una lesión sospechosa orienta altamente al diagnóstico.

Cultivo: se realiza cuando se requiere aislar el parásito para establecer su clasificación taxonómica, sensibilidad a medicamentos, estudios epidemiológicos y para diagnóstico. La muestra obtenida por biopsia o aspirado es incluida en agar sangre de conejo al 15% (NNN). Los promastigotes de *Leishmania* crecen al cabo de varios días. La sensibilidad de este método ha sido reportada entre 52.4 a 70% (González, 2004).

Métodos indirectos

PCR: se basa en la complementariedad de las dos hebras del ADN, la técnica consiste en desnaturalizar por calor o re-naturalizar al disminuir la temperatura y sintetizar cadenas hijas en presencia de cadenas molde gracias a la acción de las polimerasas, enzimas termoestables que soportan altas temperaturas sin perder su acción. El ADN del parásito se puede detectar mediante la amplificación de un fragmento de la secuencia utilizando iniciadores de la reacción de polimerización de la segunda cadena. Estos iniciadores son elaborados en laboratorio partiendo de secuencias conocidas y se unen a la hebra molde en caso de ser complementarios del parásito utilizando iniciadores. La sensibilidad de esta técnica ha sido reportada hasta de 98% ya que puede ser positiva ante la presencia de escaso número de parásitos (González, 2004)

El diagnóstico definitivo se fundamenta en la observación del agente en frotis, cortes histológicos, cultivos y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La demostración del parásito es importante para diferenciar la Leishmaniosis de otras entidades clínicas. El objetivo del trabajo de Zepa *et al.* (2002) fue comparar 5 métodos utilizados para el diagnóstico de Leishmaniosis y evaluar su sensibilidad. Dentro de los cuales se tuvo en cuenta frotis por escarificado y biopsia de piel para estudio histológico, frotis por aposición, cultivo y PCR.

Técnicas serológicas

La inmunofluorescencia indirecta y el ELISA son dos técnicas muy utilizadas, que nos miden el nivel de anticuerpos en sangre contra el parásito, con una buena sensibilidad y especificidad (González, 2004).

Hibridación con anticuerpos monoclonales: los anticuerpos son inmunoglobulinas capaces de reconocer los determinantes antigénicos de una molécula específica y constituyen una herramienta importante para la identificación de especies. Esta técnica consiste en la utilización de anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de la membrana del parásito. El uso de anticuerpos monoclonales ha permitido el reconocimiento de las especies de *Leishmania* tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo. Esta metodología tuvo gran importancia en la taxonomía de las leishmanias hace relativamente pocos años, pero actualmente su uso es limitado a pocos centros de referencia (González, 2004).

Hibridación en nitrocelulosa: la hibridación molecular es una técnica muy valiosa basada en la homología existente entre dos muestras dadas de ácidos nucleicos debido a la complementariedad entre sus bases. Esta complementariedad es evidenciada por la detección de moléculas marcadas. Generalmente la hibridación se lleva a cabo sobre un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa); la sonda (fragmento de ADN de

secuencia conocida) puede estar marcada previamente con radioactividad o con marcadores luminiscentes (González, 2004).

Inmunodiagnóstico: intradermorreacción de Montenegro: es una reacción de hipersensibilidad tardía que consiste en la aplicación intradérmica de un antígeno compuesto por una suspensión de promastigotes de *Leishmania* muertos por calor, en una concentración de 6.25×10^6 ; la prueba se lee a las 48 ó 72 horas y se considera positiva cuando el diámetro de la induración es mayor de 10mm (González, 2004).

2.4.5 Tratamiento y resistencia

En la revisión hecha por Figarella *et al.* (2003) resumen que, la leishmaniosis es una enfermedad infecciosa que constituye una de las principales causas de muerte en el mundo, especialmente en el tercer mundo, donde cada vez se hace más importante debido a que cada día crece el riesgo de coinfección con el VIH e incrementa la frecuencia de resistencia de los parásitos a las drogas.

La emergente resistencia a las drogas esta usualmente asociada con cambios de P-glicoproteína específica de membrana, pero también incluye respuestas fisiológicas complejas

En estudios realizados por Ruiz *et al.* (2004) se evaluaron ocho extractos crudos y dos fracciones de alcaloides obtenidos de siete especies vegetales provenientes de la flora colombiana, (*Abuta grandifolia*, *Piper holtonii*, *Acnistus arborescens*, *Croton leptostachys*, *Piper cumanense*, *Acacia farnesiana* y *Xilopia aromática*) fueron evaluadas in vitro frente a tres especies de *Leishmania danovanni* y *Leishmania braziliensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (tulahuen); quienes obtuvieron como resultado dos de estas especies (*Acnistus arborescens* y *Piper cumanense*) mostraron alta actividad en los ensayos realizados con valores de concentración inhibitoria 50 (CL50) menores de 12,5 ug/mL; cercanos a los obtenidos con el fármaco de referencia pentamidina 10 ug/mL.(AU).

2.5 Morfometría celular

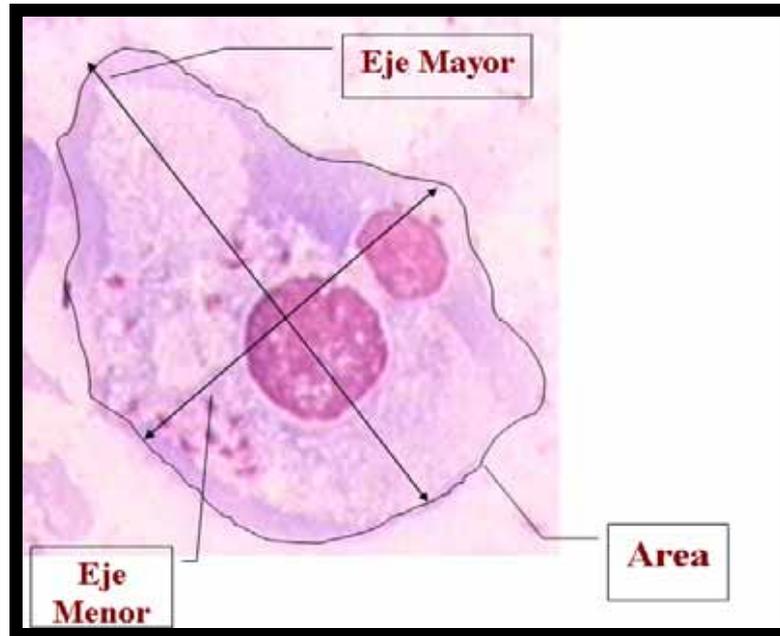


Figura 7. Medidas de área, eje mayor y eje menor de una célula de la línea celular LULO.

El término morfometría celular se refiere al análisis de ciertos parámetros de medida, tales como: longitud, área, perímetro, etc. de diferentes tejidos y formas celulares, realizados por medio de un programa analizador de imágenes (Image Proplus de Media Cybernetics). Este tipo de análisis es utilizado frecuentemente para determinar cambios en la morfología de las células o en sus estructuras, como respuesta a factores intrínsecos fisiológicos y nutricionales o extrínsecos ambientales, así como también a procesos infecciosos. Este tipo de análisis lo utilizó Elisei *et al.* (2001) para evaluar la morfología y morfometría de las formas parasitas intra-eritrocíticas de *Plasmodium juxtannucleare*, determinando el diámetro menor, el diámetro mayor y el índice morfométrico de eritrocitos

procedentes de pollos inoculados con el parásito, concluyendo que el aislado estudiado podía caracterizarse como de morfología muy diversa.

Por otro lado, se comparó la morfología de las células derivadas del mosquito *A. albimanus* (LSB-AA695BB) y *Lu. longipalpis* (LULO) antes y después de la infección con *L. panamensis* para determinar los cambios morfológicos en estos dos cultivos celulares; obteniendo como resultado, que a pesar de que no hubo una internalización evidente de los parásitos en los cultivos celulares evaluados, si se observaron cambios morfológicos en las células y que probablemente esto se produjo como consecuencia de la interacción con el parásito (Bello *et al.*, 2002).

3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Formulación del problema

Una dificultad que se presenta en la manipulación de parásitos, es la pérdida de su infectividad cuando se cultivan y mantienen en medios axénicos, lo que conlleva a la pérdida de características específicas involucradas en el proceso de infección. Debido a esto se produce una limitación en el conocimiento del patógeno y su interacción con el hospedero. Teniendo en cuenta que las líneas celulares son consideradas como un modelo primario conveniente para manipulación y mantenimiento de sistemas más complejos, se propone evaluar cultivos celulares de un insecto no vector de *Leishmania*, como posibles sustituyentes, utilizando la línea celular derivada de tejido embrionario de *Ae. aegypti*, para determinar si ésta es un sustrato efectivo para el desarrollo de *L. chagasi* y *L. braziliensis* y, por medio de un análisis morfométrico, determinar los cambios morfológicos de las células de *Ae. aegypti* frente a la infección experimental *in vitro* de los parásitos.

3.2 Justificación

Este trabajo es de importancia debido a que con él se podrá establecer si, la línea celular nativa de *Ae. aegypti*, es un buen sustrato para el mantenimiento *in vitro* de *L. chagasi* y *L. braziliensis*, además de determinar si hay interacción entre los parásitos y las células de la línea celular de *Ae. aegypti*, insecto no vector de esta enfermedad; y posteriormente plantear un modelo *in vitro* alternativo del ciclo biológico de *L. chagasi* y *L. braziliensis* frente a los cultivos axénicos y otras líneas celulares de origen macrofágicas y fibroblásticas.

Es importante resaltar que este estudio será útil como punto de comparación con posteriores trabajos, relacionados con fisiología celular,

genética y bioquímica, preparación de antígenos, estudios de resistencia a insecticidas, e igualmente en el mantenimiento y estudio de parásitos y virus, que probablemente se efectuarán con estos cultivos.

3.3 Hipótesis

H₁: La línea celular derivada de tejido embrionario de *Ae. aegypti* es un sustrato eficiente para el mantenimiento de *L. chagasi* y *L. braziliensis*.

H^o: La línea celular derivada de tejido embrionario de *Ae. aegypti* no es un sustrato eficiente para el mantenimiento de *L. chagasi* y *L. braziliensis*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la susceptibilidad de la línea celular derivada de tejidos embrionarios de *Ae. aegypti* a la infección con *L. chagasi* y *L. braziliensis*.

4.2 Objetivos específicos

Determinar los porcentajes de infección de *L. chagasi* y *L. braziliensis* en los cultivos derivados de tejidos embrionarios de *Ae. aegypti*.

Identificar las características morfométricas de los cultivos de *Ae. aegypti* teniendo en cuenta los parámetros: área, eje menor y eje mayor pre y pos-t infección.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Mantenimiento de los cultivos celulares y los parásitos

5.1.1 Cultivo de *Ae. aegypti*

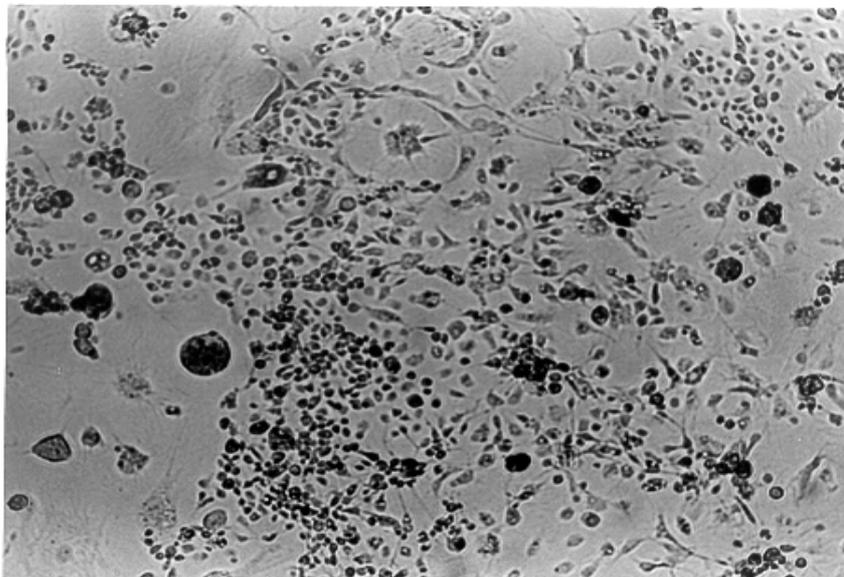


Figura 8. Monocapa del cultivo celular de *Ae. aegypti* (olympus C-K2, cámara PM-10A K3, 100X).

Se trabajó con los pases 20 al 29 de los cultivos celulares obtenidos a partir de explantes de tejido embrionario de *Ae. aegypti* en el laboratorio de Entomología, biología celular y Genética de la Universidad de la Salle, cepa Riohacha-Guajira (Ardila *et al.*, 2005).

Los cultivos se mantuvieron en frascos de 25 ml y medio Grace (Grace, 1962) (Anexo1) / L-15 (Leibovits, 1963) (Anexo 2), suplementado con SFB al 12%, albendazol 5,4 $\mu\text{g/ml}$ y una mezcla de antibiótico (penicilina 10.000 unit/ml y Sulfato de estreptomycin 10.000 $\mu\text{g/ml}$) al 1% de Gibco, en un rango de pH entre 6.3-6.8, y una temperatura de 26°C.

Para la realización de los pases se tuvo en cuenta que las monocapas celulares tuvieran un 80% de confluencia, lo cual se presentó aproximadamente cada nueve días durante dos meses.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente: se descartó el medio de los cultivos celulares contenidos en frascos de 25 ml y se les agregó 1 ml de medio nuevo Grace/L15 a cada frasco para la remoción mecánica con policia de goma. Luego se completó con 6 mL de medio Grace/L15 y se observó en el microscopio invertido la suspensión celular. Después de dos horas se observó nuevamente al microscopio para determinar la adherencia celular y la presencia de contaminantes.

El cambio de medio se realizó cada cinco días dependiendo del metabolismo y desprendimiento celular que se presentara.

Todos los materiales utilizados en el proceso de remoción de las monocapas, para obtener el pase o repique, tales como: la cabina de flujo laminar (HOLTEN LaminAir HBB2436), pipetas y policías de goma se encontraban en condiciones de esterilidad.

5.1.2 Cultivos de Macrófagos (J774)

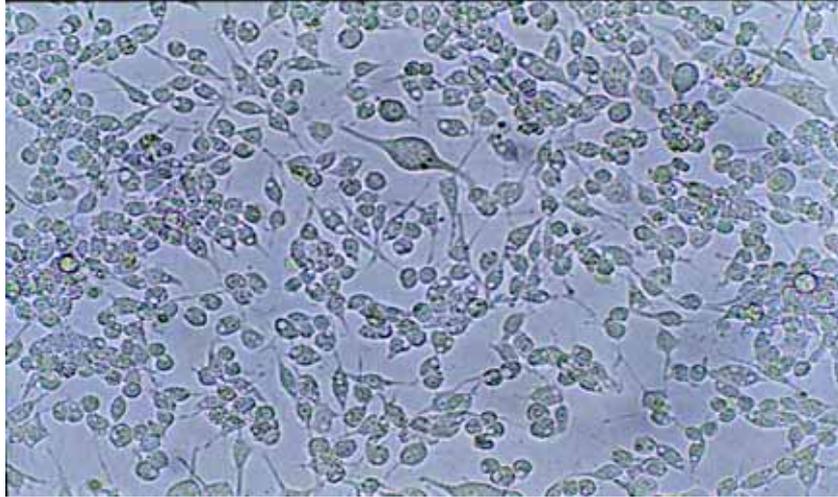


Figura 9. Monocapa de la línea celular de macrófagos J774

La línea celular de macrófagos J774 aislada de células reticulares de ratón Balb/c (Ralph & Nakoinz, 1975), se mantuvo en medio RPMI de Gibco (Anexo 3), con SFB al 15%, una temperatura de incubación de 37°C. Esta línea celular se utilizó como control positivo para la infección con las dos especies de parásitos.

El procedimiento que se siguió para la realización de los subcultivos o pases de esta línea celular con comportamiento macrofágico, fue el mismo que se utilizó para el cultivo celular de *Ae. aegypti*, salvo el medio de cultivo utilizado. Este protocolo se realizó cuando las monocapas celulares tenían una confluencia del 90% aproximadamente cada 12 días durante dos meses, tiempo en el que se realizaron todos los experimentos.

5.1.3 Parásitos



Figura 10. *L. braziliensis* y *L. chagasi* en medio NNN

Para el desarrollo de los experimentos, se utilizó la cepa HOM/BR752903 de *L. braziliensis*, suministrada por el CIF (Centro Internacional de Física) de la Universidad Nacional y la cepa MH/CO/84/CI-044B de *L. chagasi* del INS (Instituto Nacional de Salud).

La preparación de los parásitos para la infección, consistió en realizar un repique de dos tubos de 25 cm² uno por cada especie de *Leishmania*, con medio axénico NNN bifásico (Anexo 4), modificado con Schneider's de *Drosophila* (Anexo 5) y enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10% inactivado, incubados a una temperatura de 26°C. De cada tubo original se tomó 1ml de medio con parásitos y se adicionó a los tubos nuevos con medio NNN bifásico y 2ml de medio Schneider's y a los tubos originales se les adicionó 1 ml de medio Schneider's nuevo. En los días cuatro al siete después del repique, se realizó la infección debido a que los parásitos se encuentran en su estado infectivo, reconocido por el alargamiento de los promastigotes y la distancia entre el núcleo y cinetoplasto.

5.2 Criopreservación de las células de *Ae. aegypti*

Para criopreservar las células de *Ae. aegypti* (pase 29), se eliminó el medio de cultivo de un frasco de 25 ml (1) con una monocapa celular semiconfluyente y se resuspendió con 1 ml de medio Grace / L15 para desprender las células mecánicamente con un policía de goma .

En un frasco de 25 ml (2) nuevo se agregó medio de cultivo Grace / L15, 12% de SFB y 10% Dimetil Sulfóxido (DMSO) se colocó en un recipiente con hielo.

Luego se colocó el frasco original (1) en el recipiente con hielo y lentamente se le adicionó el contenido del frasco (2), agitando constantemente para homogenizar la muestra. La suspensión celular se repartió en seis crióviales de 1,5 ml.

Los seis crióviales fueron sometidos a un proceso de enfriamiento y congelación gradual que empezó con 20 minutos a 4°C, seguido de 1 hora a -20°C y toda la noche a -70°C para finalmente llevarlos a -196°C en nitrógeno líquido. Dos semanas después de la criopreservación de las células se descongeló un criovial para determinar la funcionalidad de las células de *Ae. aegypti* y los cinco crióviales restantes permanecen congelados.

5.3 Infección celular



Figura 11. Caja de 24 pozos.

Siembra: Cuando los cultivos de *Ae. aegypti* y J774 formaron la monocapa confluyente, se realizó una remoción mecánica, se depositaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se completó el volumen con solución salina al 0.9%. Luego, se concentraron las células en la centrifuga (Mistral 1000) a una velocidad de 251 gravedades durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con medio de cultivo Grace/L15 nuevo. Después se transfirieron las células a cajas de 24 pozos (Corning), en donde se les agregó 1 ml de medio Grace/L15 fresco; previamente en cada pozo se colocó una laminilla estéril de 12 mm de diámetro (Fisherbrand) en el fondo de cada pozo para la formación de la monocapa de la células evaluadas . Las células de *Ae. aegypti* y la línea celular J774 con actividad macrofágica fueron sembradas en una concentración aproximada de 2×10^5 células por pozo.

Infección: Siguiendo el mismo protocolo para concentrar las células de los cultivos celulares, se concentraron las dos especies de parásitos por separado en tubos de centrífuga (*L. chagasi* y *L. braziliensis*) utilizando la centrifuga a 700 gravedades durante 10 minutos y se resuspendieron en medio Schneider's de *Drosophila*. Luego, de alcanzar una confluencia y adherencia óptima, después de 24 horas de sembradas las células de los cultivos celulares (*Ae. aegypti* y J774), se le adicionó a cada pozo una concentración aproximada de 1×10^6 promastigotes de fase estacionaria de *L. chagasi* (MH/CO/84/CI-044B) y *L. braziliensis* (HOM/BR752903) de manera que la proporción de célula-parásito fuera de 10:1 (Fampa *et al.* 2003). Al finalizar el proceso de infección se sellaron las cajas con parafilm (para evitar el derrame y evaporación del medio líquido).

Pasadas 24 horas de la infección, las células de *Ae. aegypti* incubadas a 26°C (incubadora marca DIES) y las células de J774 a 37°C (Incubadora Nuairé DH) se les retiró el medio para eliminar las formas del parásito no interiorizadas, y se descartó en un recipiente con hipoclorito al 90 %, se lavaron los pozos con solución salina estéril al 0,90% y por último se agregó 1,5 ml de medio de cultivo Grace/L15 nuevo. Los cultivos fueron observados diariamente en el microscopio invertido marca Olympus CK2.

El día tres post- infección se eliminó el medio de todos los pozos y se retiraron las laminillas correspondientes a este día, los pozos restantes se lavaron con solución salina estéril al 0.90% y se les adicionó medio de cultivo fresco. El mismo proceso se realizó para los días seis y nueve. Este procedimiento se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los experimentos.

Los medios y el material biológico utilizados en el proceso de infección fueron inactivados y descartados según los protocolos de seguridad y desechos orgánicos.

Después de retiradas las laminillas se secaron a temperatura ambiente se les agregó metanol puro para fijar las células durante 24 horas, luego se les aplicó la tinción diferencial de Giemsa al 10% durante 15 minutos. Posteriormente se realizó el montaje permanente con “permount” sobre láminas esmeriladas (previamente lavadas con agua estéril y alcohol). Este mismo procedimiento se realizó con las láminas de los días 6 y 9. Por último se observaron al microscopio (Marca Olympus BX60) con objetivo de inmersión para determinar el porcentaje de infección

5.4 Microscopía electrónica

Se realizó la identificación ultraestructural de las células de *Ae. aegypti* y J774 infectadas con el parásito de *L. chagasi* (MH/CO/84/CI-044B) por medio de la técnica de microscopía electrónica. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de análisis de imágenes del Instituto Nacional de Salud. Posteriormente se realizaron cortes de 60 a 90 nm con el ultramicrotomo LKB, coloreados con acetato de uranilo en citrato de plomo y observados en el MET ZEISS EM 109.

5.5 Morfometría celular

Se realizó un estudio morfométrico en el cual se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: el área de las células del cultivo celular de *Ae. aegypti* en ausencia y presencia de la infección.

Para este análisis se evaluó una población de 350 células sin infección y expuestas a las dos especies de parásito por cada día post-infección, seleccionadas aleatoriamente. Las láminas previamente fijadas con metanol puro y coloreadas con Giemsa en los días 3, 6 y 9 día post-infección y en los mismos días pero sin infección. Se hizo la captura de imágenes por medio de una cámara Sony Hyper HAD adaptada a un microscopio óptico CH30 Olympus. Las imágenes transferidas al

computador se analizaron por medio del software IMAGE- PROPLUS 5 de Medya Cybernetics

5.6 Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de infección, teniendo en cuenta la cantidad de células infectadas por campo, además se calculó el número de amastigotes en cada una de las células infectadas.

Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad para realizar un análisis de varianza (ANOVA) se aplicó un análisis no paramétrico, utilizando el software STATISTICA 6 y como alternativa una prueba de Kruskal Wallis y una prueba U de Mann Whitney de comparación de medias independientes con un nivel de confianza del 95%.

Para el estudio morfométrico de los cultivos celulares de *Ae. aegypti* con respecto al parámetro de área celular de las células no infectadas e infectadas se utilizó el software IMAGE-PROPLUS 5 de Medya Cybernetics.

Se aplicó un test de Kolmogorov-smirnov para determinar la distribución de los datos con un nivel de confianza del 99%. Sin embargo, éstos no cumplieron con los supuestos del ANOVA, por lo tanto se realizó una prueba de Kruskal Wallis y una prueba U de Mann whitney de comparación de medias, además de un histograma de frecuencias como lo sugiere Nogueira (1998).

6 RESULTADOS

6.1 Comportamiento celular

Los pases 20 al 29 de los cultivos celulares de *Ae. aegypti* durante el proceso de mantenimiento presentaron cambios en la forma y tamaño de las células. Después de realizar los subcultivos de células de *Ae. aegypti* aproximadamente cada nueve días durante dos meses, las dos formas más comunes fueron la fibroblastoide y epitelioide, siendo esta última la forma más frecuente y la cual se caracteriza por células poligonales, con dimensiones más bien regulares.

6.2 Criopreservación de células de *Ae. aegypti*

La viabilidad de las células criopreservadas se confirmó después de dos semanas de realizada la congelación. En este tiempo se realizó la descongelación y se observó la formación de la monocapa confluyente en 10 días.

6.3 Infección Celular

24 horas después de la infección se observaron cada uno de los pozos bajo el microscopio invertido evidenciando una fuerte asociación de los parásitos (*L. chagasi* MH/CO/84/CI-044B y *L. braziliensis* HOM/BR752903) con las células *Ae. aegypti* al igual que con el control positivo J774.

En los días 3, 6 y 9 establecidos para la observación y toma de datos de las células infectadas, se determinó la presencia de vacuolas

parasitóforas en el citoplasma de las células de *Ae. aegypti* tanto con *L. chagasi* como con *L. braziliensis* (Fig.12 y Fig.13 a, b y c). Este hecho, indicó que hubo una internalización efectiva del parásito en las células de *Ae. aegypti*.

De manera similar, en las células J774 con actividad macrófagica se observaron gran cantidad de vacuolas parasitóforas confirmando el estado de infectividad de los parásitos (Fig.112d y 113d).

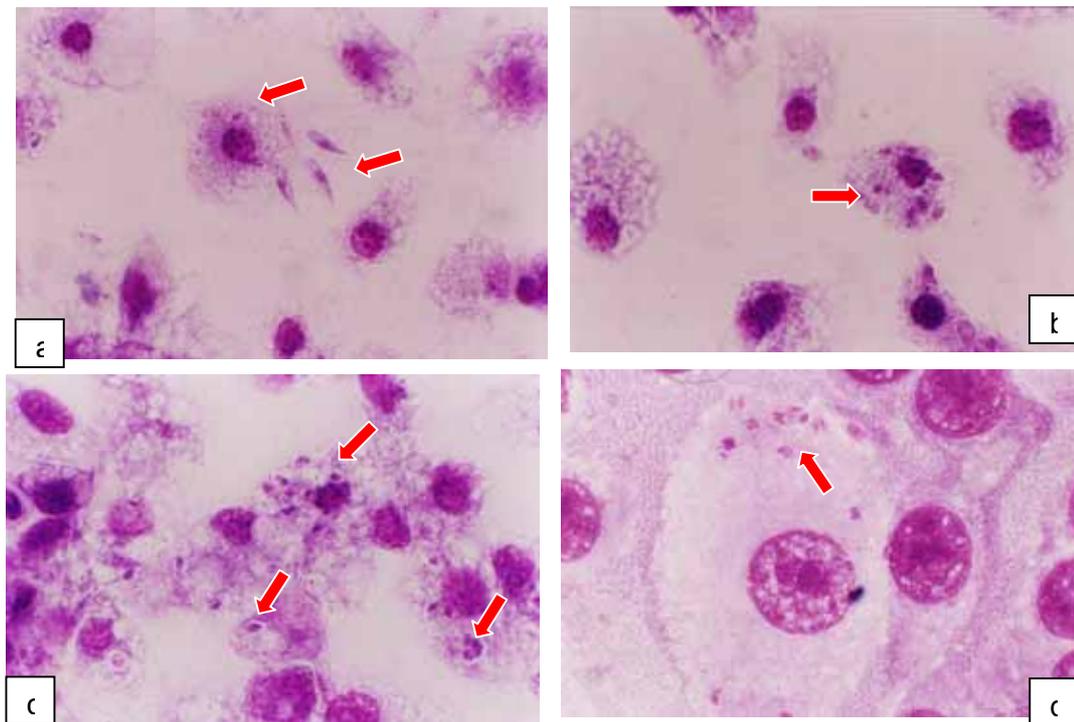


Figura 12. Infección celular de *Ae. aegypti* con *L. chagasi* MH/CO/84/CI-044B 1000X a) En el día tres se observa un amastigote y diferentes promastigotes interactuando una célula. b) En el día seis se observan múltiples amastigotes en una sola célula c) y en el día nueve post-infección no se distinguen las membranas celulares pero hay una diferenciación clara de las formas amastigotes. d) Se observa una célula de J774 con capacidad macrófagica con múltiples amastigotes en su interior, al sexto día post-infección.

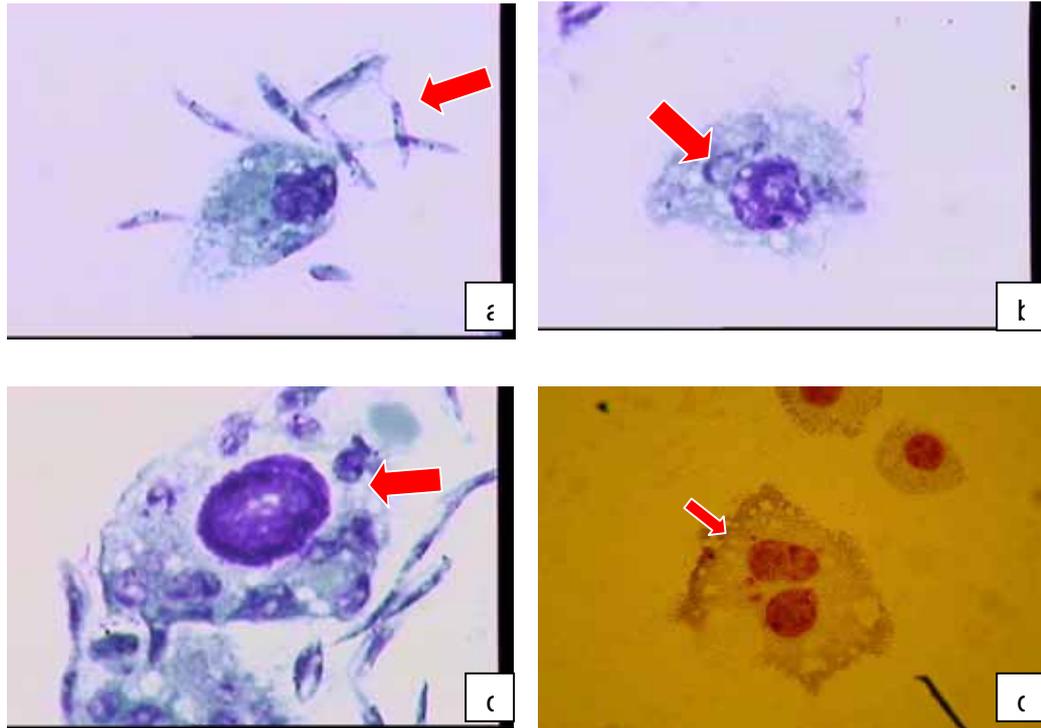


Figura 13. Infección celular del cultivo *Ae. aegypti* con *L. braziliensis* HOM/ BR752903.1000X. a) En el día tres se observó la presencia de diferentes promastigotes teniendo contacto con una célula, b) en el día seis se observó gran cantidad de vacuolas en el citoplasma de una célula, además de varios amastigotes. c) En el día nueve se observó un núcleo prominente y definido; y el citoplasma con presencia de diferentes amastigotes. d) En el control positivo (J774), por su parte se pudo observar la infección por la presencia de los amastigotes señalados.

6.3.1 Porcentaje de infección

El registro de infección indicó que en el día seis se presentó, en promedio el mayor porcentaje de infección (Fig. 14) para las células de *Ae. aegypti* inoculadas con *L. braziliensis* (29,8%). También se observó que este porcentaje disminuyó significativamente en el día nueve (18,8%) comparado con los días tres y seis (Tabla 6) (Anexo 11).

Según las pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney (Prueba U) se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0022$) para la proporción de la infección de *Ae. aegypti* con *L. braziliensis* en el día seis post-infección, comparado con los días tres y nueve (Anexo 6 y 10).

Para el porcentaje de infección (Fig. 14) del control positivo (J774), se observó un aumento progresivo desde el día tres (13,9%) hasta el día nueve, este último presentando el valor más alto (48,8%) (Tabla 7 y Anexo 12).

En cuanto a los estadísticos aplicados se determinó que hubo diferencias entre los diferentes días evaluados con el análisis de Kruskal Wallis ($P=0,000$) (Tabla 6 y Anexo 7).

Tabla. 6 Promedios del porcentaje de infección y número de amastigotes por célula de *Ae. aegypti* y J774 con *L. braziliensis* y *L. chagasi*.

Días post-infección	<i>Ae. aegypti</i> Promedio				J774 Promedio			
	<i>L. cha</i>		<i>L. bra</i>		<i>L. cha</i>		<i>L. bra</i>	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
3	6,9	12,2± 0,18	4,2	20,5± 0,2	4,2	15±0,17	2,6	13,9±0,16
6	7,1	12,4± 0,12	5,2	29,8± 0,2	4,7	36,3 ±0,2	5,9	36,9±0,15
9	5,1	6,7 ± 0,1	7,2	18,8± 0,1	5,1	30,2±0,13	3	48,8±0,2
P=	0,219		0,0022		0,0000		0,0000	

N°= promedio del número de amastigotes %= porcentaje promedio de infección
n= 350 células

P= (< 0,001) Diferencia altamente significativa
(< 0,005) Diferencia significativa
(> 0,05) No hay diferencias

Por otro lado, para las células de *Ae. Aegypti* infectadas con *L. chagasi* (Tabla 6 y Anexo 13) en promedio el porcentaje más alto se evidenció el día seis (12,5%), al igual que con *L. braziliensis*, aunque no existió una diferencia importante entre este día y el día tres (Fig.14). De acuerdo con lo que indicó el resultado de la prueba Kruskal Wallis ($P > 0,05$) no existieron diferencias significativas entre las proporciones de infección para los diferentes días evaluados (Anexo 8).

De la misma forma, en el porcentaje de infección (Fig. 14) de J774 con *L. chagasi* se observó que el valor más representativo se presentó el día seis (36,3%), el cual fue significativamente mayor que para el día tres (15%) (Anexo 14). En el día nueve (30,2%) se observó una disminución del porcentaje, no obstante se mantuvo alto comparado con el día tres.

Según los resultados de los análisis con los test de Kruskal Wallis y Mann Whitney para el control positivo infectado con *L. chagasi*, se encontraron diferencias entre las proporciones de infección de los diferentes días evaluados con un $P < 0.0001$ (Anexo 9 y 10). El día en el cual se presentó la media más alta fue el día seis contrario a lo que sucedió con el día tres presentando la media más baja.

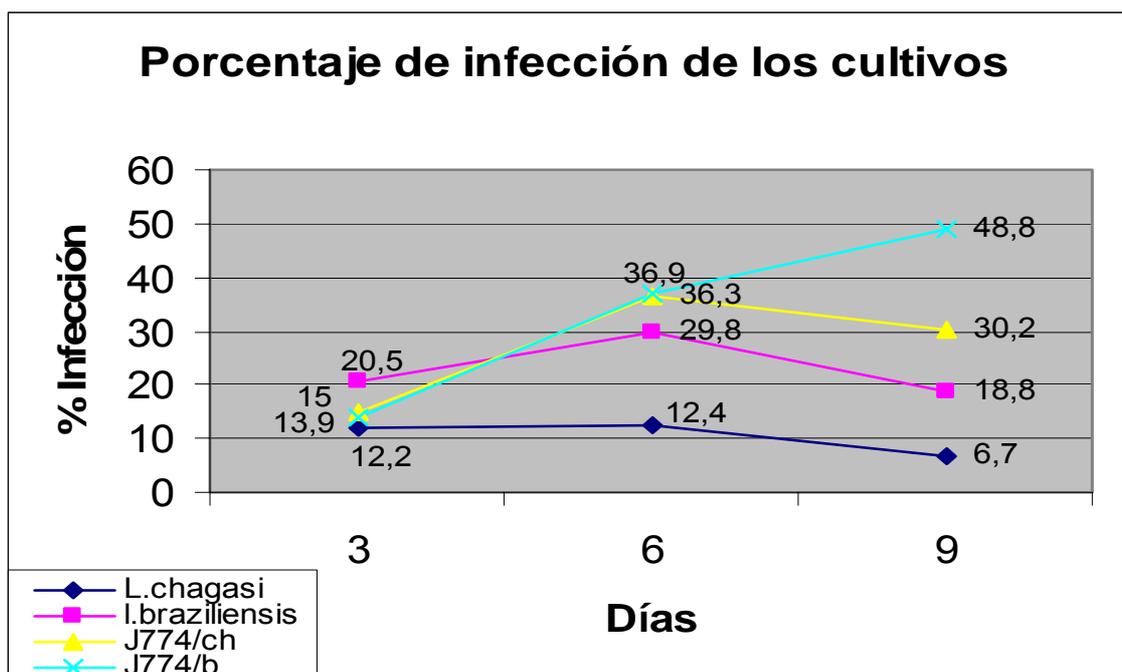


Figura 14. Porcentaje promedio de infección de los cultivos de *Aedes aegypti* y J774 inoculados con *L. chagasi* y *L. braziliensis* en los días post-infección indicados.

Por otro lado, se puede decir que hubo una diferenciación de las formas promastigotas del parásito en las células de *Ae. aegypti* debido a la presencia de las formas amastigotes en todos los días post-infección evaluados.

En las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis* (Tabla 6) se presentó el mayor número de amastigotes intracelulares el día nueve, con un promedio de 7,2 por célula (Anexo 15). Por su parte, La mayor

cantidad de amastigotes en la línea celular J774 infectada con *L. braziliensis* (Tabla 6) se presentó el día seis con un promedio 5,9 amastigotes/célula (Anexo16).

Además se evidenció que el número de amastigotes en las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis* aumento gradualmente a medida que avanzaban los días post-infección. A diferencia de lo ocurrido en las células del control en las cuales el número de amastigotes por célula aumento hasta el sexto día y en el noveno día disminuyó notoriamente.

Por el contrario en las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi* se evidenció en promedio, la mayor cantidad de amastigotes en el día seis post-infección con 7,1 amastigotes/célula (Tabla 6 y Anexo 17), diferente a lo observado en las células de J774 infectadas con el mismo parásito, en la cual el día nueve presentó una mayor cantidad de amastigotes con un promedio de 5 por célula (Tabla 6 y Anexo 18).

En la infección de las células de *Ae. aegypti* con *L. chagasi* se presentó un aumento del número de amastigotes por célula hasta el día seis y una clara disminución en el día nueve post-infección.

6.3.2 Promedio de los porcentajes de infección y amastigotes por célula de los Cultivos celulares.

Los porcentajes promedio del cultivo celular evaluado y el control con las dos especies de parásitos mostrados en la fig. 15 indican que se presentó un mayor porcentaje de infección en el cultivo de *Ae. aegypti* infectado con *L. braziliensis* (22,8%) comparado con el infectado con *L. chagasi* (12,1%). De la misma forma ocurrió, en la línea celular control (J774) en la cual se observó el más alto valor promedio con el parásito *L. braziliensis* (31,1%).

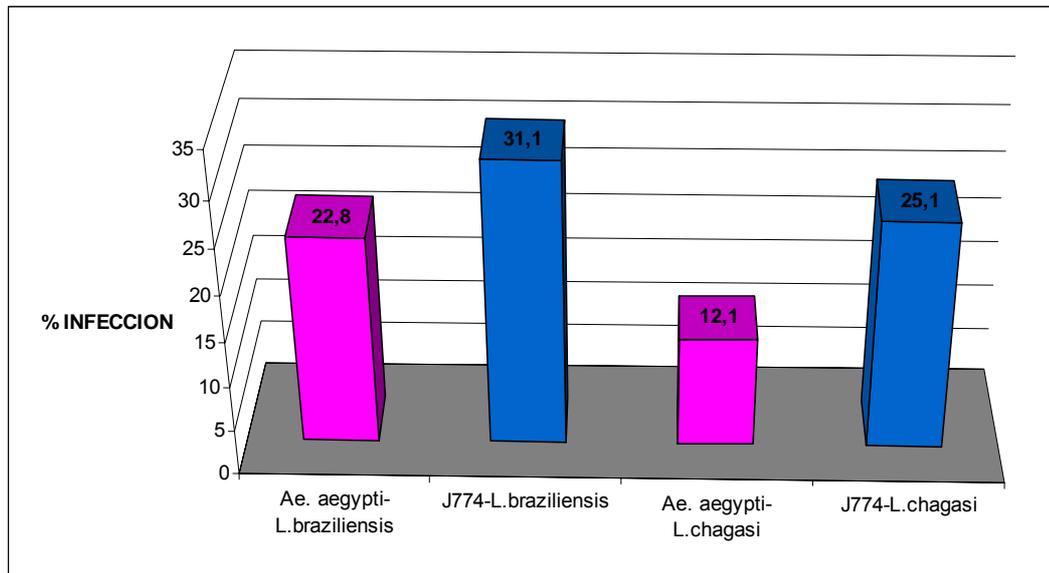


Figura 15. Porcentaje promedio de infección de los cultivos celulares infectados con *L. chagasi* y *L. braziliensis*.

Por su parte, se registró el mayor número de amastigotes por célula en los cultivos de *Ae. aegypti* infectados con *L. chagasi* comparado con su control y la infección con *L. braziliensis* (Fig.16).

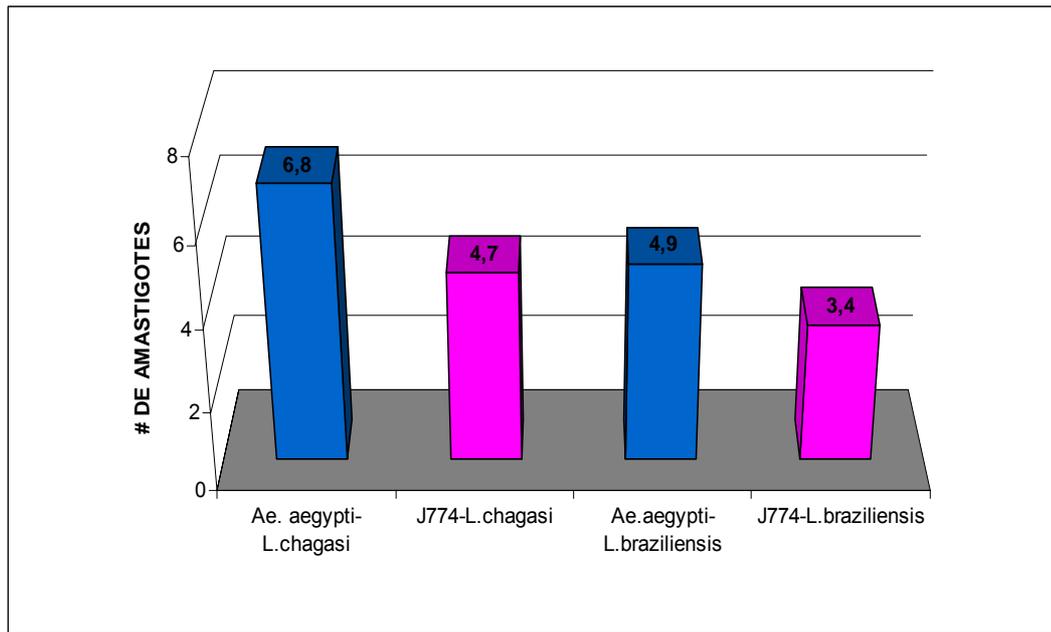


Figura 16. Promedio de amastigotes por célula en los cultivos celulares infectados con *L. chagasi* y *L. braziliensis* (pool de datos de las células infectadas en los 3,6 y 9 días post-infección).

De igual manera las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis* presentaron una mayor cantidad de amastigotes por célula que su respectivo control.

6.3.3 Observaciones con microscopía electrónica de transmisión.

Para demostrar la internalización efectiva del parásito *L. chagasi* se realizó un análisis ultra-estructural de las células de *Ae. aegypti* y el control positivo J774 infectadas con el parásito.

Se observaron células de *Ae. aegypti* con una morfología totalmente conservada, identificándose orgánulos característicos tales como: núcleo, mitocondrias y vacuolas (Fig.17a). Además, con la presencia de un parásito intra-vacuolar con saco flagelar (Fig.17b) bien definido se confirmó la internalización y transformación de éste.

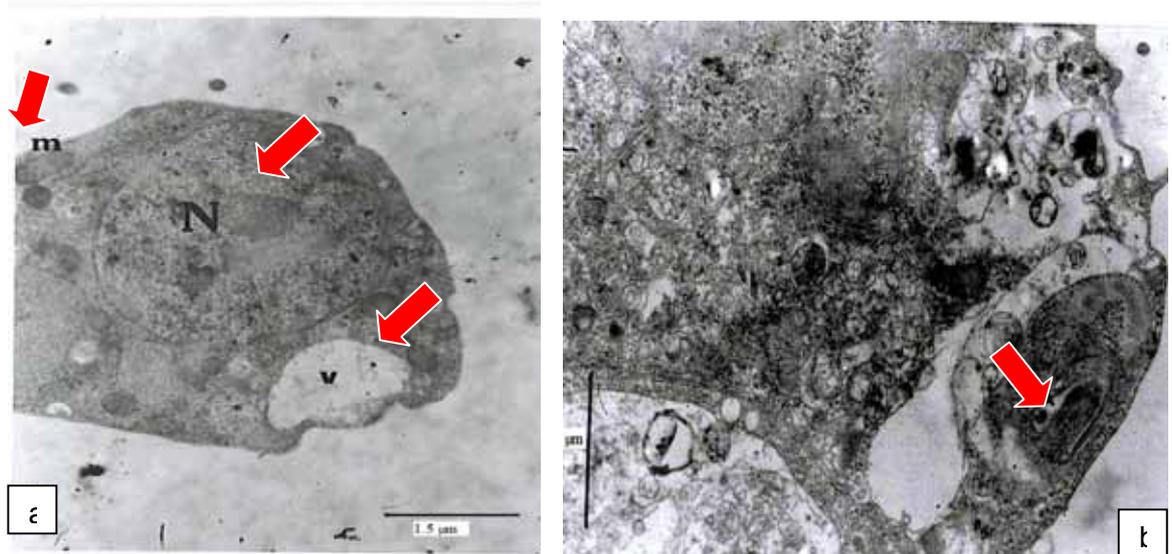


Figura 17. a) Célula de *Ae. Aegypti* con material organelar característico (flechas) 12000X. b) Célula de *Ae. Aegypti* con una vacuola parasitofora (flecha) 24000X barra= 1.0 µm.

En el estudio ultra-estructural realizado a las células control positivo J774 se evidenció la presencia de formas amastigotas estrechamente unidas a la vacuola (Fig.18a), en las cuales se observaron las estructuras organelares típicas del parásito como: núcleo, saco flagelar y cinetoplasto.

También como parte de la célula J774 se observaron numerosas vacuolas con material de degradación en su interior.

Por su parte, en la figura 18b se observó un retículo endoplasmático rugoso muy prominente, un amastigote intravacuolar bien definido y numerosas vacuolas en el citoplasma de la célula J774.

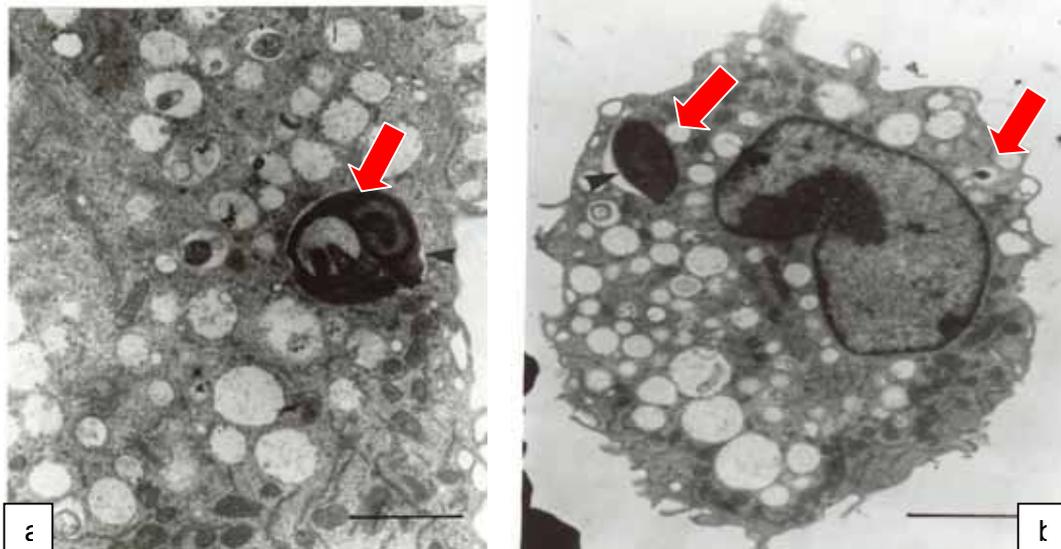


Figura 18a) Célula J774 infectada con un parásito intravacuolar 12600 X barra=1.5 μ m. b) Célula J774 infectada con numerosas vacuolas 5400 X barra= 1.5 μ m.

6.4 Morfometría de las células de *Ae. aegypti*

6.4.1 Observación de los cambios morfológicos

El test de Kolmogorov- Smirnov mostró que los grupos no presentaron una distribución normal ($p < 0.01$). Se determinó que existían diferencias estadísticas entre el área de las células no infectadas de *Ae. aegypti* y las células de *Ae. aegypti* infectadas tanto con *L. chagasi* como con *L. braziliensis* (Kruskal Wallis $P < 0,05$) siendo las células infectadas más grandes que las células no infectadas (Anexo 19).

El histograma de frecuencias se realizó teniendo en cuenta el área en micras cuadradas, los días post-infección (3,6 y 9) y el número de las células de *Ae. aegypti* no infectadas (control, barras azules), y las células de *Ae. aegypti* infectadas tanto con *L. chagasi* (Barras rosadas) como con *L. braziliensis* (barras amarillas). Las células analizadas no necesariamente se encontraban infectadas, pero sí expuestas a la presencia del parásito (Anexo 20).

La figura 19 ilustra la distribución de los valores de las áreas separadas en rangos que van desde $12 \mu\text{m}^2$ hasta mayores de $3972 \mu\text{m}^2$. Se observó que el área celular en el día tres post-infección para las células de *Ae. aegypti* no infectadas se mantuvo en el rango de 12 a $1332 \mu\text{m}^2$. Para la interacción de las células de *Ae. aegypti* con las dos especies de parásitos; la mayor cantidad de células infectadas con *L. chagasi* se concentró en los rangos de área de 892 a $2212 \mu\text{m}^2$, diferente a lo ocurrido en las células con *L. braziliensis*, donde la mayoría de las células se ubicaron en el rango de área de 12 a $493 \mu\text{m}^2$ y mayores a $2652 \mu\text{m}^2$.

En el día seis post-infección se observó una distribución similar a la del día tres para las células no infectadas de *Ae. aegypti*, al igual que para las infectadas con *L. chagasi*. Por el contrario, la frecuencia de las células

infectadas con *L. braziliensis* cambió su distribución al aumentar el rango de área entre $893\mu\text{m}^2$ y mayores a $1773\mu\text{m}^2$.

Por último, en el día nueve se observó que la células no infectadas aumentaron el rango de área hasta $1772\mu\text{m}^2$ y que las células infectadas con las dos especies de parásitos mantuvieron la distribución de frecuencias en rangos mayores a $2000\mu\text{m}^2$.

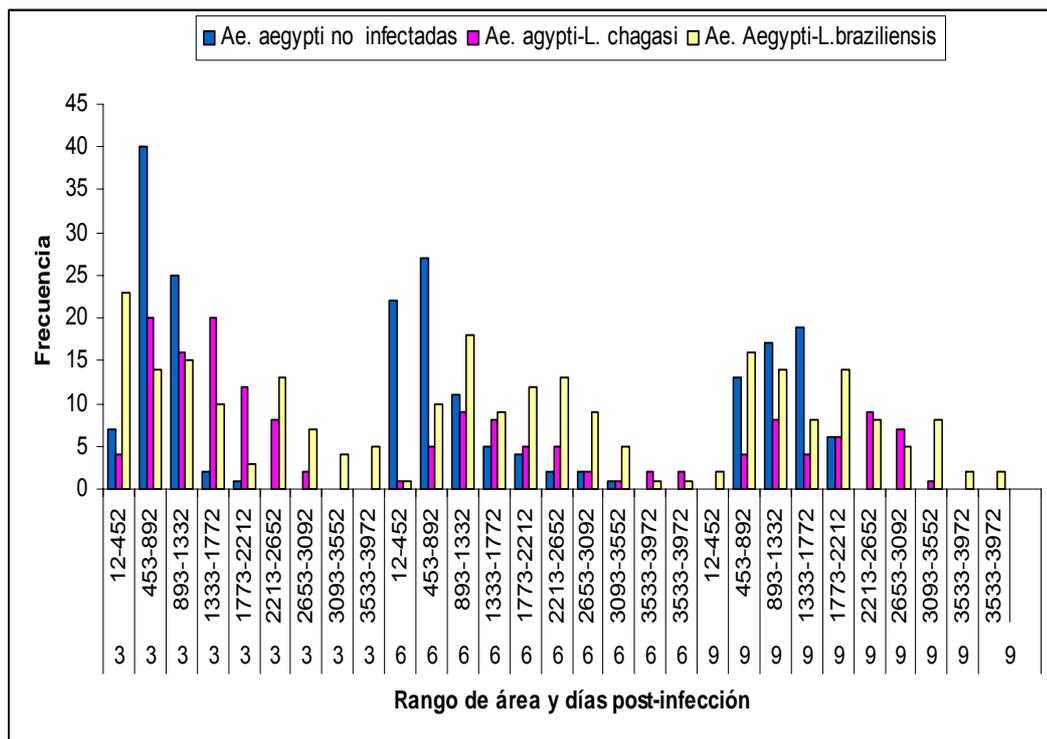


Figura 19. Frecuencia de células de *Ae. aegypti* en los rangos de área y días post-infección indicados.

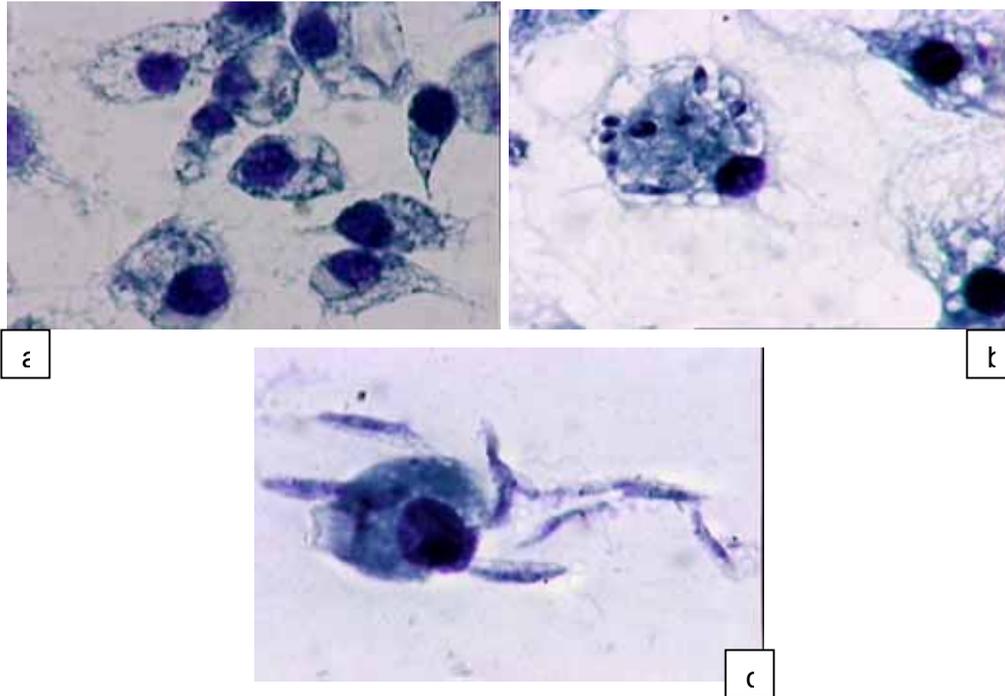


Figura 20. a) Células de *Ae. aegypti* pre-infección. b) Células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi* y c) *L. braziliensis*.

La figura 20 muestra los cambios morfométricos y las diferencias en tamaño entre las células no infectadas y las infectadas, lo cual es claramente visible

6.5 DISCUSIÓN

6.5.1 Comportamiento celular

Los cultivos celulares requieren condiciones específicas para lograr establecer poblaciones óptimas para el estudio de procesos biológicos de forma similar a lo que ocurre *in vivo*. Dentro de éstas, los requerimientos nutricionales son de gran importancia para su mantenimiento, en razón a que, determinan el crecimiento y comportamiento celular. En este estudio se mantuvieron las condiciones nutricionales establecidas por Ardila *et al.* (2005) para los cultivos primarios y subcultivos de las células de *Ae. aegypti*, a excepción del SFB, el cual se redujo al 12%. Del mismo modo, se mantuvo el rango de pH entre 6.3-6.8, y la temperatura de incubación

a 26°C. Tanto estos factores como los nutricionales, determinados por los medios de cultivo y demás elementos adicionados a éste, son primordiales para la propagación y comportamiento de los cultivos *in vitro*, debido a que una carencia o exceso de cualquiera de ellos puede interrumpir el crecimiento celular (Burleson *et al.*, 1992).

Así mismo, dependiendo del tipo celular los factores físico-químicos para su desarrollo son diferentes. La mayoría de las líneas celulares necesitan una adición de SFB del 5 al 10% como un suplemento para promover la multiplicación celular. La línea J774 de comportamiento macrofágico, utilizada en este estudio como control positivo de la infección, fue suplementada con 5% de SFB y se caracterizó por presentar un núcleo ovoide y la cromatina condensada, presentaron formas variadas debido a sus movimientos por pseudópodos en el proceso de fagocitosis. Las poblaciones celulares de macrófagos se han utilizado como blanco para diferentes estudios y en especial para los realizados con el género de *Leishmania*, debido a su capacidad de sobrevivir en condiciones axénicas (Madeira *et al.*, 1999).

Se ha reportado que durante las etapas iniciales de los cultivos celulares de insectos, las colonias de células formadas son heterogéneas, según lo señalan Grace (1966), Singh (1967), Varma y Pudney (1969), Peleg (1965) y Ardila *et al.* (2005) en sus trabajos sobre el establecimiento de cultivos de diferentes tejidos de mosquitos del género *Aedes*. Estos mismos autores señalan que una vez se obtienen monocapas confluentes durante el desarrollo de los subcultivos, la morfología celular tiende a ser más uniforme y generalmente epitelioide. Esta forma celular no sólo es característica en las líneas y cultivos celulares de mosquitos sino que también se ha presentado en una mayor proporción en líneas y cultivos celulares de otros insectos, como es el caso de lepidópteros (Grace, 1962) y algunos flebótomos (Rey *et al.*, 2000; Zapata, 2004).

Por otro lado, se evidenció que las monocapas de algunos cultivos de *Ae. aegypti* tuvieron la tendencia a formar aglomeraciones celulares adheridas a la superficie del frasco de cultivo, observación que coincide con lo encontrado en los cultivos establecidos por Grace en 1966. Sin embargo, Burlenson (1992), Rey (2000) y Ardila *et al.*, (2005) entre otros autores, quienes reportan que a medida que los cultivos evolucionaron hacia una línea celular, se empezó a observar una homogenización de las monocapas en los pases más altos (Fig.8).

6.5.2 Infección celular

Es importante aclarar que aunque *Ae. aegypti* no es vector de leishmaniosis, está reportado como vector de otras infecciones tales como: Dengue, fiebre Amarilla y malaria aviaria; y es considerado como uno de los modelos biológicos más importantes en términos de enfermedades transmitidas al hombre (Blair *et al.*, 2000; Zieler *et al.*, 2000).

No obstante, en el proceso de infección se demostró la interacción entre las células de los cultivos de *Ae. aegypti* derivados de tejido embrionario con *L. chagasi* y *L. braziliensis* (fig. 12 y 13 a,b,c). Esta interacción se evidenció por el contacto del flagelo del parásito con las células evaluadas. Hecho que indicó la existencia de algún tipo de afinidad del parásito por las células y que además se confirmó con la presencia de vacuolas y amastigotes en su interior.

Lo anterior señala que no solo existe una interacción entre los parásitos y las células del mosquito sino que también se dieron procesos de internalización, transformación y maduración de las dos especies de *Leishmania*.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Dedet & Odette en 1977, en uno de los primeros ensayos de infección de *L. donovani*,

quienes utilizaron una línea celular derivada de tejido de un mosquito (*Ae. albopictus*) y reportaron presencia de amastigotes intracelulares.

Aunque no existen estudios que determinen puntualmente la interacción entre el parásito y las células de sus vectores, los cultivos celulares de *Ae. aegypti* a pesar de no ser un vector de protozoos del género *Leishmania* se infectaron con las dos especies de parásitos, posiblemente debido a un sistema ligando-receptor conservado entre insectos.

Fampa *et al.* (2003) indicaron la importancia del reclutamiento de receptores de las células para el proceso de fagocitosis en la cual hay una estrecha asociación de la membrana con la superficie de la partícula para la formación del fagosoma. En cuanto a la superficie de los promastigotes Sacks y Kamhawi (2001), identificaron carbohidratos responsables de la adhesión de *Leishmania* al intestino de los flebótomos, los cuales son de gran importancia para el establecimiento y mantenimiento de los parásitos. Esta posible adhesión, generalmente en la interacción hospedero-patógeno, es determinada por el polimorfismo especie-específico del LPG del parásito (Locksley y Louis, 1992). El LPG es la molécula más abundante en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*, que cubre toda la superficie del parásito e incluye el flagelo, formando un denso glicocáliz específico para todos los promastigotes (Restrepo *et al.*, 1999). El LPG parece ser la llave para determinar la sobrevivencia del parásito, tanto en el invertebrado como en el vertebrado (Sacks *et al.*, 1994).

Al igual que las células de *Ae. aegypti*, en las células J774 se registró todo el proceso de internalización y maduración de los promastigotes (fig.12 y 13 d), con la diferencia que la interacción de las células con los promastigotes no se prolongó durante mucho tiempo como en las células de *Ae. aegypti*, probablemente debido a que la temperatura de las células de *Ae. aegypti* fue de 26°C, ideal para el desarrollo y mantenimiento de las formas promastigotes; por el contrario, la temperatura de incubación

de las células J774 a 37°C pudo ser un factor estresante para los parásitos que no lograron entrar a las células, disminuyendo su viabilidad con el paso de los días.

Durante la observación y registro del proceso de infección tanto con *L. braziliensis* como *L. chagasi* en los días indicados de post-infección (3, 6 y 9), se determinó que el porcentaje de infección para las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis* incrementó significativamente desde el día tres hasta el día seis y disminuyó notoriamente en el día nueve (Tabla 6). Esta disminución se puede deber a la liberación de los amastigotes intracelulares al medio y muerte de las células. Scout y Hunter (2002) reportaron que una vez se inicia la infección, *Leishmania* invade principalmente macrófagos en la piel. Los parásitos se multiplican en los fagolisosomas y eventualmente hay una ruptura de las células hospederas, para empezar la invasión de otros tipos celulares.

Por otro lado, el porcentaje de infección para los diferentes días en las células de *Ae. aegypti*, infectadas con *L. chagasi*, tuvo valores más bajos que para la infección con *L. braziliensis*. Sin embargo, la distribución de este porcentaje en los diferentes días post infección fue similar al reportado para *L. braziliensis*, presentando el pico más alto de infección el día seis.

En cuanto al porcentaje descrito para el control positivo, se encontró que para las células J774 infectadas con *L. braziliensis* hubo incrementos significativos del día tres, al día seis, hasta llegar al máximo valor en el día nueve post infección (Tabla 6). Contrario a lo observado para las células J774, infectadas con *L. chagasi*, en las cuales hubo un incremento significativo del porcentaje del día tres al día seis, siendo este último día donde se obtuvo el valor más alto y una pequeña disminución del porcentaje hacía el día nueve post-infección.

Probablemente, el éxito de la infección en las células de *Ae. aegypti* se deba en parte a que la temperatura de 26°C, es óptima para el mantenimiento de estos cultivos y, simultáneamente también para los promastigotes de *Leishmania*. La susceptibilidad de las especies de *Leishmania* al estrés por temperatura, se ve reflejada su habilidad para establecer la infección de las diferentes partes del cuerpo del mamífero. Además, es un factor muy importante para el establecimiento de la infección en el flebótomo vector (22-28°C) y en el hospedero mamífero (31-37°C) (Zilberstein y Shapira, 1994).

Así, los macrófagos sean considerados la célula hospedera más importante para los parásitos de *Leishmania*, hay otros tipos celulares en los que también se ha demostrado la endocitosis de *Leishmania in vitro* e *in vivo*. Estos incluyen neutrófilos, eosinófilos, células fibroblásticas y epitelioides (Bodgan *et al.*, 2000; Engwerda *et al.*, 2004).

El control positivo J774, como era de esperarse, presentó un porcentaje de infección más elevado que el de las células de *Ae. aegypti*, debido a su capacidad macrófaga (Ralph y Nakoinz, 1975) las cuales se encuentran adaptadas fisiológicamente como células hospederas del parásito.

Numerosos reportes, en los cuales se evaluó la multiplicación *in vitro* de diferentes especies de *Leishmania* sugieren la correlación con el sistema *in vivo* donde observaron la limitada capacidad de *L. braziliensis* para desarrollarse en macrófagos murinos, comparada con la de *L. chagasi*. Sin embargo, en el presente estudio los porcentajes de infección tanto en células de *Ae. aegypti* como de J774 fueron mayores con *L. braziliensis*.

Con respecto a lo anterior, Janovy y Poorman (1969) establecieron que las especies de *Leishmania* relacionadas con las manifestaciones cutáneas tenían un metabolismo normal de la glucosa máximo a una temperatura de 35°C, mientras que las especies involucradas en manifestaciones viscerales lo hacían a 37°C. Este probablemente, puede ser un factor que explica la razón por la cual, se presentó un mayor porcentaje en la células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis*

(forma mucocutánea) comparado con el porcentaje que se presentó con *L. chagasi* (forma visceral).

Un aspecto indispensable en la invasión, es el estado infectivo del promastigote, como consecuencia del proceso de metaciclologénesis el cual comprende cambios bioquímicos y antigénicos (Rivas *et al.*, 1993). Este proceso se da tanto al interior del flebótomo, coincidiendo con la migración de promastigotes del tubo digestivo a la probóscide, como en cultivos *in vitro*, cuando se alcanza la fase de crecimiento estacionaria, después de la fase de crecimiento logarítmico. No obstante, la capacidad de lograr un estado metacíclico disminuye después de mantener durante un tiempo prolongados cultivos en medio axénico (Sacks y Perkins, 1984, Sacks y Kamhawai, 2001).

De esta manera, en este estudio se tomó en cuenta que los componentes del medio de cultivo tuvieran los nutrientes mínimos necesarios para el desarrollo del proceso de infección y que los parásitos de *Leishmania* se encontraran en un estado óptimo infectivo en el momento de la interacción con las células de *Ae. aegypti in vitro*.

El número de amastigotes para las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi* se observó por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica, mientras que la infección con *L. braziliensis* en los mismos sustratos celulares se registró únicamente con la técnica de microscopía óptica.

En las observaciones realizadas con microscopio de luz se pudo evidenciar la infección con *L. chagasi* y *L. braziliensis* por la presencia de amastigotes intracelulares solos o en grupos, contenidos en vacuolas parasitóforas.

El registro del número total de amastigotes arrojó resultados significativos, al igual, que los resultados obtenidos para el promedio de amastigotes por célula teniendo en cuenta los días evaluados. Esto indicó que hubo un proceso de replicación efectivo al interior de las vacuolas parasitóforas y que además los macrófagos no son un tipo celular

exclusivo en la infección con promastigotes, similar a lo que se reportó en otros estudios *in vitro* (Dedet *et al.*, 1983; Bogdan *et al.*, 2000; Scout y Hunter, 2002)

En las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi*, el mayor número promedio de amastigotes por célula se presentó el día seis post-infección, diferente a lo ocurrido en las células de *Ae. Aegypti* infectadas con *L. braziliensis*, en donde el mayor número promedio de amastigotes por células se presentó el día nueve; sin embargo, no hubo una diferencia marcada entre los dos promedios.

Es probable que los promastigotes de *L. chagasi* que penetraron a las células antes de realizar el lavado con solución salina a las 12 horas, hayan alcanzado las formas amastigotes y se hayan replicado en gran cantidad de una manera temprana hacia el día tres, debido a las condiciones óptimas de temperatura tanto para los promastigotes como para las células. Sin embargo, el pico máximo para el número promedio de amastigotes de *L. chagasi* por célula de *Ae. aegypti* se presentó al día seis (Tabla 6). Por el contrario, en las observaciones hechas en el día nueve post-infección el número de amastigotes empezó a disminuir, lo que puede verse explicado con base en las demandas nutricionales insuficientes y a lisis celular.

En cuanto, al comportamiento de los promastigotes de *L. braziliensis* se observó un aumento gradual del número promedio de amastigotes por célula hasta alcanzar el valor más alto el día nueve (Tabla 6). Esta situación se ha presentado en otro estudios *in vitro* como el realizado por Nancy & Diggs (1981) quienes reportaron que el número de amastigotes de *L. major* en macrófagos incrementaba significativamente a partir del sexto día hasta el octavo día post-infección, contrario a lo que sucedió con el número de células infectadas a partir del día seis, las cuales disminuyeron significativamente.

En otros estudios (Courret *et al.* 2001) se determinó que el proceso de diferenciación de la forma promastigote a la forma amastigote empezó horas después de la fagocitosis y tomó al menos cinco días en completarse.

Un rasgo notable de estos parásitos es su habilidad para sobrevivir en ambientes hostiles, ya que ellos deben evitar la destrucción en el intestino del mosquito vector donde el microorganismo puede ser susceptible a las enzimas digestivas que degradan el alimento; en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado donde el parásito está expuesto a la vía lítica del complemento, y en el fagolisosoma de macrófagos mamíferos ya que en el momento en que el parásito entra allí en forma de promastigote se activan varios mecanismos de defensa como liberación de enzimas hidrolíticas y la explosión respiratoria microbica (Restrepo *et al.*, 1999)

En *L. donovani* se ha reportado que el mayor tamaño del LPG inhibe la fusión fagosoma – endosoma y reduce los radicales libres y los iones superóxido que son liberados durante la fagocitosis, esto daría tiempo al promastigote para diferenciarse en amastigote, que es más resistente a la acción de las enzimas y el pH ácido del fagolisosoma (Restrepo *et al.*, 1999; Decker *et al.*, 2004).

Recientemente se describió que la formación de vacuolas parasitóforas ocurre de manera diferente dependiendo del estado del parásito internalizado, al menos en términos cinéticos. Esto se evidenció en un trabajo realizado por Dermine *et al.* (2000) en el cual, después de la fagocitosis de promastigotes en fase estacionaria de *L. donovani* en células J774, los parásitos se localizaron transitoriamente en fagosomas con pocas propiedades de fusión al contrario de lo que sucedió cuando hubo una internalización de amastigotes. Ellos concluyen que las características que se presentaron en los fagosomas tempranos podrían estar ligadas a un estado específico de expresión del LPG en la membrana del promastigote, el cual puede modificar la capacidad de

unión de la membrana fagosomal, al menos temporalmente (Sacks & Kamhawai, 2001, Goyard *et al.*, 2003). De la misma manera Lang *et al.* (1994) y Sacks y Sher (2002), reportaron que después de la fagocitosis las vacuolas parasitóforas adquieren las características de un compartimiento lisosomal en términos de poseer una membrana, que mantiene un pH ácido y actividad hidrolítica. Éste ambiente, permite la acción de otras moléculas involucradas en la sobrevivencia del parásito como la gp63, que evita la citólisis intrafagosomal (Rivas y López, 1993).

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio se observaron las vacuolas parasitóforas, características de un proceso de infección efectivo en el cual jugaron un papel importante factores tales como: la temperatura, el pH y los nutrientes proporcionados por el medio de cultivo Grace/L15. Con estos factores disponibles es probable que los procesos moleculares en los cuales se ven involucrados moléculas como el LPG y gp63 anteriormente mencionadas hayan cumplido el rol que ha sido descrito para ellas en el proceso de internalización, transición de formas promastigotes a formas amastigotes y protección de los parásitos.

En general, se encontró que el número promedio de amastigotes entre las células de *Ae. aegypti* infectadas, fue mayor para *L. chagasi* (6.8) comparado con *L. brazileinsis* (4.9).

Como se ha señalado en diferentes estudios, la temperatura es un factor importante para la conversión de la forma promastigote a la forma amastigote. Saar *et al.* (1998) desarrollaron un método *in vitro* para la diferenciación de promastigotes de *L. donovani* en amastigotes, sometiendo los promastigotes a temperatura de 37°C y un pH de 5.5 durante 24 horas y el proceso invertido para volver a promastigotes con una temperatura de 26°C y pH de 7.4. Un sistema similar desarrollaron Ismael *et al.* (1998) con *L. mexicana*, quienes, además, compararon el sistema *in vitro* e *in vivo* con *Lu. Longipalpis*. Otros autores (Zilberstein y

Shapira, 1994; Barack *et al.*, 2005) revisaron la situación que ocurre al exponer promastigotes de *Leishmania*, principalmente de especies originarias de Sur América a temperaturas de mamíferos (33-37°C) bajo condiciones axénicas *in vitro*; notaron que causaba cambios morfológicos similares a los que ocurrían durante la transformación de promastigotes en amastigotes al interior de macrófagos.

A diferencia de los registros, la transformación de los promastigotes de las dos especies de parásitos en amastigotes se presentó en las células de *Ae. aegypti* a una temperatura de 26°C, sin hacer ninguna variación, demostrando una buena afinidad por las células de este mosquito.

En cuanto al número de amastigotes de *L. braziliensis* y *L. chagasi* por célula encontrados en las células control positivo J774, el valor promedio más alto de amastigotes teniendo en cuenta los días post-infección evaluados se presentó el día seis para *L. braziliensis* y el día nueve para *L. chagasi* (Tabla 6), esto probablemente se debe a los aspectos mencionados anteriormente para la infección de las células de *Ae. aegypti*.

Hay que destacar que a pesar que el porcentaje de infección de los controles fue más alto, el número promedio de amastigotes por célula fue mayor en las células de *Ae. aegypti*, lo cual es indicativo de la capacidad proliferativa de los parásitos en estas células.

6.5.3 Microscopía electrónica de transmisión

Con este análisis ultra-estructural de las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi* se confirmó la internalización y transformación del parásito. Demostrando la capacidad de las células de este mosquito para mantener y replicar los parásitos como sucede en las células de hospederos vertebrados. Además, se observó un estado conservado de los

componentes celulares tales como: núcleo, mitocondrias y vacuolas con material de desecho (fig. 17y 18).

Lang *et al.* (1994), utilizando macrófagos Balb/c infectados con *L. donovani* pudieron observar diferentes tipos de vacuolas parasitóforas en estrecha relación con los amastigotes y una clara diferenciación de los organelos tanto del parásito como del macrófago. Del mismo modo, Chang y Dwyer (1978) demostraron por medio de microscopia electrónica que las vacuolas parasitoforas de *L. donovani* son capaces de fusionarse con compartimientos parecidos a lisosomas.

En un estudio ultra-estructural realizado por Fampa *et al.* (2003), mostraron la adhesión de diferentes tripanosomátidos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas* y *Leptomonas*) a diferentes líneas celulares de insectos, entre ellas una de *Ae. albopictus*, en las cuales la adhesión se podía dar tanto por medio del cuerpo celular como por el flagelo. Además de observar que las mitocondrias de las células de insecto generalmente se distribuían alrededor de la vacuola que contenía el parásito.

Por el contrario, en las células de *Ae. aegypti* no se observó una disposición de las mitocondrias alrededor de la vacuola, sin embargo, se registró claramente una vacuola parasitofora con un amastigote y su paquete flagelar.

Por otro lado, Bogdan *et al.* (2000) demostraron la internalización de *L. major* en células fibroblásticas, utilizando como herramienta la microscopía electrónica de transmisión, además de concluir que probablemente el medio ambiente de estas células era menos hostil que el de los macrófagos para la persistencia del parásito.

6.5.4 Morfometría celular

Se demostró que la replicación de los parásitos provocó cambios en la morfología celular de *Ae. aegypti*, determinados por el área celular en micras cuadradas. Las células infectadas con *L. braziliensis* predominaron en los rangos de área mayores a 2000 μm^2 al igual que para las células infectadas con *L. chagasi*. Por el contrario, el mayor número de células no infectadas, utilizadas como control se presentaron en el rango de área de 12 a 1332 μm^2 (fig.19).

Debido al proceso de infección las células experimentaron un aumento en el área celular hasta alcanzar tamaños mayores a 2000 μm^2 ; rango en el cual, no se presentaron células no infectadas (fig. 19y 20).

Algo similar ocurrió en un estudio realizado por Nogueira (1998), en el cual estudió las alteraciones morfométricas de células de McCoy infectadas y no infectadas con el virus de la rabia, para identificar la relación entre el incremento del tamaño celular y la capacidad de replicación viral.

Por otro lado, los resultados estadísticos mostraron diferencias significativas entre las áreas células no infectadas e infectadas ($p < 0,05$ prueba U de Mann Whitney y Kruskal Wallis).

Si se comparan las medidas obtenidas para las células sin infección de *Ae. aegypti* con las reportadas por Grace (1966), cuando estableció un cultivo celular para el mismo mosquito, se puede decir que coinciden en que la mayoría de las células de éstos dos estudios, ubicándose en el rango de 400 a 800 μm^2 (Fig.18). Lo cual, indica que definitivamente la interacción de los parásitos con las células de *Ae. aegypti*, si provoca fuertes cambios morfológicos.

Carrasco *et al.* (1989), reportaron que la replicación viral en células de mamíferos induce cambios en la morfología y culmina en la lisis celular. Estos cambios generalmente se ven reflejados en la permeabilidad de la membrana que ocurre durante la replicación viral y se le atribuyen a diferentes factores como: la acción de proteínas virales que se unen a la membrana y distorsiona la capa de lipoproteínas, el incremento de la actividad fosfolipasa ó el incremento Ca^{2+} intracelular.

Del mismo modo, en parásitos se ha reportado que el incremento del Ca^{2+} citosólico también, está involucrado en la invasión de diferentes géneros de parásitos, incluido el género de *Leishmania*, y en los cambios morfológicos de las células infectadas con el parásito (Docampo y moreno, 1996). El Calcio también juega un papel importante, al unirse con el LPG porque producen un cambio en la transducción de señales, y la protein-kinasa C se activa de una forma deficiente, por lo que genera un bloqueo en la respuesta oxidativa del macrófago, de modo que no afecta el parásito (Tolson *et al.*, 1990; Decker *et al.*, 2004).

7 CONCLUSIONES

Se observó, que existe interacción entre las células de *Ae. aegypti* con *L. chagasi* y *L. braziliensis*.

Los promastigotes de *L. chagasi* y *L. braziliensis* lograron penetrar en la células derivadas de tejidos embrionarios de *Ae. aegypti*, transformarse en formas amastigotas y multiplicarse en el interior de las células evaluadas.

Se evidenció la capacidad de las células de *Ae. aegypti* para la internalización de los parásitos, por la presencia de vacuolas y formas amastigotas en su interior.

Se observó una fuerte adherencia de los parásitos a las células de *Ae. aegypti*, probablemente debido a receptores de membrana conservados entre insectos vectores de enfermedades.

En las células J774, control positivo, de igual manera, se confirmó la interacción e internalización

Se evidenció que el mayor porcentaje se presentó en las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis*, probablemente debido a la capacidad de respirar a menor temperatura que *L. chagasi*.

Se observó que el mayor porcentaje de infección se presentó el día seis, tanto en las células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi* como con *L. braziliensis*.

Se confirmó por microscopía electrónica la infección de los cultivos celulares con *L. chagasi*, con detalles ultraestructurales de la morfología del parásito y las células.

Se encontraron cambios en el área celular de las células de *Ae. aegypti* infectadas por la influencia de los parásitos, comparado con las no infectadas.

8 RECOMENDACIONES

Utilizar cultivos con el mismo número de pases para obtener mejores resultados en la infección.

Realizar procesos de recuperación de los parásitos de amastigote a promastigote en los sustratos celulares utilizados.

Realizar procesos de infección en el cultivo celular de *Ae. aegypti* utilizando diferentes tipos de arbovirus y otras especies de *Leishmania*.

Utilizar como alternativa para el control positivo, macrófagos de hamster o de ratón obtenidos de lavados peritoneales ó células de sangre periférica humana, para garantizar la acción fagocítica y garantizar el proceso infectivo de los promastigotes de *Leishmania*.

Utilizar marcadores específicos con microscopia electrónica para observar carbohidratos presentes en la membrana de los parásitos.

Realizar índices de adhesión de los parásitos a las células evaluadas.

9 LITERATURA CITADA

Anónimo. 1994. Leishmaniasis. En: Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina. CIDEIM. pp. 6-80

Anónimo. 1995. Leishmaniasis. Guía Integral de Manejo. Ministerio de Salud.

Ardila, A. Escovar, J y Bello, F. 2005. Características de Nuevos Cultivos Celulares derivados de Tejidos Embrionarios de *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biomédica*. 25:65-75

Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N. y Zilberstein, D. 2005. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Molecular and Biochemical Parasitology* 141: 99–108

Bate, A.P. 1994. The Developmental biology of *Leishmania* Promastigotes. *Experimental Parasitology*. 79: 215-8.

Blair, C.D; Adelman, Z.N y Olson, K.E. 2000. Molecular Strategies for Interrupting Arthropod-borne Virus transmission by Mosquitoes. *Clinical Microbiology Reviews*. 13 (4): 651-661.

Bello, F., Morales, A., Boshell, J., Rey, G. y Olano, V. 1994. Establecimiento y Caracterización de Líneas Celulares de Mosquitos de interés médico. *Biomédica*. 14 (1): 7.

Bello, F., Boshell, J., Rey, G., Morales, A. y Olano, V. 1996. Initiation of Primary Cell Cultures from Embryos of the mosquitoes *Anopheles albimanus* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 90:547-51.

Bello, F., Rey., Jiménez, M. E., Munsterman, L. y Ferro, C. 1996. Iniciación de Cultivos Celulares Primarios de *Lutzomia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Diógenes Revista de investigación en Ciencias y Enseñanza de las Ciencias. 3:155-66.

Bello, F.J., Rodríguez, J., Morales, A., Olano, V. y Rey, G. 1999. Estudio de Cultivos Celulares Primarios de *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae). Biomédica. 19: 127-135.

Bello, F.J., Rodríguez, J.A., Escovar, J., Olano, V.A., Morales, A., Gonzalez, M. y Rey, G. 2001. A New Continuous Cell Line from The Mosquito *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) and its Susceptibility to infections with Some Arbovirus. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. 96: (6) 865-873.

Bello, F.J., Cano. R., Garnica, S., Escovar, J. y Palau, M.T. 2002. Análisis Morfométrico de Dos Líneas Celulares de Insectos (LSB-AA695BB y Lulo) y susceptibilidad a la Infección con *Leishmania panamensis*.

Bogdan, C., Donhauser, N., Döring, R., Röllinghoff, M., Diefenbach, A. y Rittig, M.G. 2000. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. Journal of Experimental Medicine. 191 (12): 2121–2129

Burleson, F.G., Chambers, T.M. y Wiedbrauk, D.L. 1995. Virology a Laboratory Manual. Academic Press, Inc. U.S.A. p.8-33

Carrasco, L., Otero, M.J. y Catrillo, J.L. 1989. Modification of membrane Permeability by Virus infection. Pharmacology and Therapeutics. 23:109-145.

Chan-Bacab, J. y Peña Rodríguez, L. M. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Research*. 18: 674-688.

Chang, K.-P. y Dwyer, D. M. 1978. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *Journal of Experimental Medicine*. 147: 515-530.

Charpentier, G., Belloncik, S., Ducros, G., Fontanille, D., Tian, L. & Quiot, J.M. 1995. Establishment and characterization of three cell lines from *Aedes triseriatus* (Diptera:Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 32(6):793-800.

Cooper, G.M. 2000. Growth of Animal Cell Culture. In: *The Cell a Molecular Approach*. Second Edition. Ed. Sinauer Associates Inc. pp. 685

Corredor, A., Kreutzer, R.D., Tesh R.B., Boshell, J., Palau, M.T., Cáceres, E., Duque, S., Pelaez, D., Rodríguez, G. y Nichols S. 1990. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42(3):206-14.

Corredor, A., Alvarez, C.A., Agudelo, C. A., Bueno, M., López, M. C., Cáceres, E., Reyes, P., Beltan, S., Gualdrón, L.E. y Santacruz, M.M. 1999. Prevalence of *Trypanosoma Cruzi* and *Leishmania Chagasi* Infection and Risk Factors in a Colombian Indigenous Population. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*. 41 (4): 229-234.

Courret, N., Fréhel, C., Gouhier., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., y Antoine, J.C. 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*. 115: 2303-2316.

Davis, J.M. 1996. Basic Cell Culture: a Practical Approach. Oxford. 301p.

Decker, L., Salaiza, N., Aguirre, M., Gutierrez, L. 2004. Leishmaniosis. En: Flores, B., Cabello, R. Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad. Mc Graw-Hill. México. Capítulo 10: 65-72

Dedet, J.P. y Odette, G.G. 1977. *Leishmania donovani* multiplication in a Cell Line of *Aedes albopictus*. Transaction Royal of Society of Tropical Medicine. And Hygiene. 70 : (5-6) 535-536.

Dedet, P., A. Ryter, E. Vogt, P. Hosli, y L. P. DaSilva. 1983. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. Annals Of Tropical Medicine And Parasitology. 77:35-44.

Dermine, J.-F., Scianimanico, S., Privé, C., Descoteaux, A., y Desjardins, M. 2000. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. Cell Microbiology. 2:115-126

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis. Nature Reviews of Microbiology. 2: 692-693.

Docampo, R. y Moreno, S.N.J. 1996. Parasitology Today. 12:2 61-65.

Eagle, H. 1955. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. Science. 122 :501–504.

Elisei, C., Souza, P.C.A., Massard, C.L. & Soares, C.O. 2001. Caracterización morfológica y morfométrica de *Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). Parasitología al día. 25: (1-2) 716-725.

Engwerda, C.R., Ato, M. y Kte, P.M.2004. Macrophages , Pathologyand Parasite Persistence in Experimental Visceral Leishmaniasis. Trends in Parasitology. 20 (11):524-530.

Fampa, P., Correa Da-Silva, M.S., Lima, D.C.,Oliveira, S.M., Motta, M.C. & Saraiva, E.M. 2003. International Journal For Parasitology. 33(10):1019-26.

Figarella, K., Uzcátegui, N., García, N; Silva, N., Camacho, N. y Ponte Sucre, A. 2003.Molecular pharmacology of chemo-resistant leishmania. Archivos venezolanos de farmacología. 22(1):19-24.

Ghosh, M. y Bandyopadhyay,S. 2004. Interaction of Leishmania parasites with dendritic cells and its functional consequences. Immunobiology 209: 173–177

González, F. y Zerpa, O. 2004. Leishmaniasis cutánea en la infancia. Dermatol Pediatr Lat. 2(2): 97-108.

Goyard, S., Segawa, H., Gordon, J., Showalter, R.D., Turco, S. J. & Beverley, S.M. 2003. An *In Vitro* System for Developmental and Genetic Studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. Molecular and Biochemical Parasitology. 130: 31-42.

Grace, T.D.C. 1962.Establishment of Four Strain of Cell from Insect Tissue Grow *In vitro*. Nature 195: 788:789.

Grace, T.D.C. 1966. Establishment of a Line of mosquito. (*Aedes aegypti* L.) Cell Grown *In Vitro*. Nature. 211: 366-367.

Handman, S. 2001. Leishmaniasis. Current Status of Vaccine Development. Clinical Microbiology Reviews. 14: (2) 229-243.

Hendricks, L.D., Wood, D.E. y Hajduk, M.E. 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology*. 76(3): 309-16

Igarashi, A., Sasso, F. y Fukai, K. 1973. Intracellular components associated with Chikungunya virus-specific ribonucleic acids in infected BHK21 cells. *Japanese Journal Of Microbiology*. 17(5):401-8.

Jacobson, R.L. 1995. *Leishmania* LPG and the Sandfly Connection. *Parasitology Today*. 11: (6) 203-4.

Jaffe, C.L., Grimaldi, G. y McMaho-Pratt, D. 1983. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel, C. Genes and antigens of parasites. Instituto Do Oswaldo Cruz. Second Edition. Rio de Janeiro. pp.47-59

Janovy, J. Jr., y Poorman, A. E. 1969. Temperature and metabolism in *Leishmania*. I. respiration in *L. donovani*, *L. mexicana* and *L. tarentolae*. *Experimental Parasitology*. 25:276-282

Kitamura, S. 1965. The *in vitro* cultivation of tissue from the mosquito *Culex pipiens V. molestus*. II. A improved cultured medium useful for ovarian tissue culture. Kobe, *Journal of Medical Science*. 11: 315-433.

Kohler, G y Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256:495.

Lang, T., Hellio, R., Kaye, P. y Antoine, J.C. 1994. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous Vacuole and potencial Role of this Organelle in Antigen Presentation. *Journal Of Cell Science*. 107: 2137-2150.

Leibovits, A.1963. The Growth and Maintenance of Tissue-cell Cultures in Free Gas Exchange with the Atmosphere. *Am J Hygiene*. 78: 173-80.

Locksley, R.M. y Louis, J.A. 1992. Immunology of Leishmaniasis. *Current opinion in immunology*. 4:413-418.

Lynn, D. 1999. Development of Insect Cell Lines: Virus Susceptibility and applicability to Prawn Cell Culture. *Methods in Cell . Science*. Vol 21: 173-181

Locksley, R.M. y Louis, J.A. 1992. Immunology of Leishmaniasis. *Current Biology*. 4: 413-418.

Lynn, D. 2001. Novel Techniques to Establish New insect Cell line. *in Vitro Cellular and Developmental Biology*. Vol.37:319-24.

Madeira, M.F., Barbosa-Santos, E. y Marzochi.1999. Experimental Infection of Canine Peritoneal Macrophages with visceral and Dermotropic Leishmania Strains. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 94 (5):645-648

Masters, J. R. W. 2000. *Animal Cell Culture*. . Third Edition. Editorial Oxford University Press. Great Britain. pp.315

Molyneux, D.H. y Killick-Kendrick, R. 1987. The leishmaniasis volume I. Morphology, Ultrastructure and life cycles. Academic Press. London. 121-174.

Montoya-Lerma, J., Cadena-Peña, H. & Consuelo Jaramillo-Salazar. 1998. Rearing and Colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a Vector of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93(2): 263-268

Culex (culex) theileri (Diptera: Culicidae) and its Susceptibility to Infection with Arboviruses. *Journal of Medical Entomology*. 27: 939-944.

Olano, V. y Tinker, M. 1993 Fauna de Mosquitos asociada con *Aedes aegypti* en Guaduas, Colombia, SA. *Biomédica*. 13:71-4.

Peleg, J. 1965. Growth of Mosquito tissues *In Vitro*. *Nature*. 206: 427-428.

Peleg, J. 1968. Growth of Arbovirus in Primary Tissue Culture of *Aedes aegypti* Eastern equine encephalomyelitis virus, Semliki Forest virus, West Nile virus. *American of Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 17 (2): 219-223.

Ralph y Nakoinz 1975. Direct Toxic Effects of immunopotentiators on monocytic, Myelomonocytic, and histiocytic or Macrophage Tumor Cells in Culture. *Cancer Research.*, 37:546-550

Restrepo, C., Muskus, C., Ramírez, R., Berberich, C. y Patiño, P. 1999. Determinación del papel de la proteína asociada al LPG (KMP-11) de *Leishmania* sobre la función de las células fagocíticas. *Revista de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología*. 8 (3):

Rey, G., Ferro, C. y Bello, F. 2000. Establish and Characterization of a New Continuous Cell Line from *Lutzomia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its Suceptibility to Infections with Arbovirus and *Leishmania chagasi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* Vol.95:103-110.

Rivas-López, L. y López-López, M. C. 1993. *Parasitología Molecular*. Consejo superior de Investigaciones científicas. Madrid. pp. 430

Ruiz, G., Garavito, G., Acebey, C., Arteaga, Lucia., Pinzon, y R., Gimenez, A. 2004. Actividad leishmanicida y tripanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia. *Biofarbo*. 12(12):27-30.

Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S. y Plumblee J. 1998. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular And Biochemical parasitology*.5: 9–20.

Sacks, D. L., y Perkin, P. V. 1984. Identification of infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 223: 1417-9.

Sacks, D. L., Saraiva, E. M., Rowton, E., Turco, S.J., y Pimenta PF .1994. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* 108: 55-62.

Sacks, D. y Sher, A. 2001. Evasion of Innate immunity y Parasitic Protozoa. *Nature Immunology*. 3 (11): 1041-1046.

Sardelis, M.R., Edelman. R., Klein, T.A., Innis, B.L., Putnak, J.R., Jones, J. W. y Turell, M.J. 2000. Limited potential for transmission of live Dengue virus vaccine candidates by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 62 (6): 698-701.

Sato, J. D., Kawamoto, T., McClure, D.B. Y Sato G.H. 1984. Cholesterol requirement of NS1 mouse myeloma cells for growth in serum-free medium. *Molecular Biology and Medicine*. 2(2):121-34.

Scott, P., Hunter, C.A., 2002. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Current Opinion In Immunology*. 14:466–470.

Sereno, D. y Lemesre, J. L. 1997. Axenically Cultured Amastigote Forms as a In Vitro Model for Investigation of antileishmaniasis Agents. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*.41: (5) 972-975.

Severson, D. W., Thathy, V., Moria, A., Zhang, Y. y Christensen, B. M. 1995. *Genetics*. 139: 1711-1717.

Silva, E., Morales, L., Ortiz, J. y Porras, M.L. 2002. Ministerio de Salud, dirección pública, Oficina de Epidemiología. INS, subdirección de epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia. Informe epidemiológico Nacional. 7 (21).

Sierra, D., A., Vélez, I. D. y Uribe, S. 2000. Identificación de *Lutzomia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo *verrucarum* por medio de microscopia electrónica de sus huevos. *Revista de biología Tropical*. 48: (2-3).

Singh. 1967. Cell Cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). *Current Science*. 36:506-508.

Tesh, R.B. 1980. Establishment of Two Cell Lines from the Mosquito *Toxoergynchites Amboinenses* (Diptera: Culicidae) and their Susceptibility to Infection with Arbovirus. *Journal of Medical Entomology*. 17: 338-343.

Tesh, R.B. 1983. Development of a Continuous Cell Line from the Sand Fly *Lutzomia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its Susceptibility to Infection with Arboviruses. *Journal of Medical Entomology*. 20 : (2) 199-202.

Tinker, M. y Olano, V. 1993. Ecología de *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Sur América. *Biomédica*. 13:5-14

Tolson, D.L., Turco, S.J y Pearson, T.W. 1990. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*. 58(11): 3500–3507.

Vago, C. 1972. *Invertebrate Tissue Culture*. Edit. Academic Press. Vol II. New York. pp. 415.

Varma, M.G. R. y Pudney, M. 1969. The Growth and Serial Passage of Cell Lines from *Aedes aegypti* (L.) Larvae in Different Media. *Journal of Medical Entomology*. 6:(4) 432-439.

Vásquez, L., Sierra, D. y Rojas, E. 2002. Mecanismos de Transmisión de la Leishmaniasis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 22 (2) 1-11.

Zapata, A. C. 2004. Estudio de los Cultivos Celulares Derivados de *Lu. Spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) Caracterización y Susceptibilidad a la Infección con *L. braziliensis*. *Tesis de Maestría en Microbiología*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia.

Zerpa, O., Borges, R., Loyo, N., Galindo, W., Belisario, D., Rodríguez, N., Sosa, A., & Convit, J. 2002. Comparación de cinco métodos para diagnóstico de leishmaniasis. *Dermatología de Venezuela*. 40(4) 106-110.

Zieler, H. y Dvorak, J.A. 2000. Invasion *in vitro* of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *PNAS* . 97 (21):11516-11521.

Zilberstein, D. y Shapira, M. 1994. The Role of pH and Temperature in the Developmental of Leishmania Parasites. Annual Review of Microbiology. 48:449-470

Zuluaga, M. y Robledo, S. M. 2004. Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis. Biomédica. 24:302-317.

Recursos electrónicos

Altamirano, A. J. 2000. Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas del Antigua Perú por la Leishmaniasis tegumentaria de forma mucosa. Fundación Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 211p.

http://portaldeseres.citt.fiocruz.br/transf.php?script=thes_chap&id=000108031ng=pt&nrm=iso

Anónimo. 1996. OPS. Epidemiología y control de leishmaniasis en las Américas por país o territorio. Cuaderno técnico N° 44.

<http://www.paho.org/Spanish/HCP/HCT/VBD/epi-y-control.pdf>

Anónimo. 2001. Ministerio de salud. Grupo de vigilancia en salud pública. *Leishmania*. Semana epidemiológica N° 45.

http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2001/BOLE46_2001.htm

Anónimo. 2004. Ministerio de Protección Social. Resolución 0809.

<http://www.minproteccionsocial.gov.co/Nsecontent/images/news/DocNewsNo7602.pdf>

Cristian De Duve. 2003. Institute of Cellular Pathology Université Catholique de Louvain

<http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/>

Reina, M. 2003. Capítulo 1 : Introducción al cultivo celular. En: Técnicas de estudio de líneas celulares.

<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>

Uribarren, T. 2004. Leishmaniosis.

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasito/protozoa/Leishmaniosis.htm>

ANEXO 1. Componentes del medio de Cultivo Grace

Componentes	(g/l)
Cloruro de Calcio (anhidros)	1.0
Cloruo de Magnesio(anhidros)	1.068189
Sulfato de Magnesio (anhidros)	1.357858
Cloruro de Potasio	2.24
Fosfato de Sodio Monobasico	0.876923
B-Alanina	0.2
L-Alanina	0.225
L-Arginina.HCl	0.7
L-Ácido Aspartico	0.35
L-Asparagina	0.35
L-Cisteina.2HCl	0.025
L- Ácido Glutamico	0.6
L-Glutamina	0.6
Glicina	0.65
L-Histidina	2.5
L-Isoleucina	0.05
L-Leucina	0.075
L-Lisina.HCl	0.625
L-Metionina	0.05
L-Fenilalanina	0.15
L-Prolina	0.35
DL-Serina	1.1
L-Treonina	0.175
L-Triptofano	0.1
L-Tirosina.2Na	0.07202
L-Valina	0.1
p-Ácido Aminobenzoico	0.00002
D-Biotina	0.00001
Cloruro de Colina	0.0002
Ácido Fólico	0.00002
Myo-Inositol	0.00002
Niacina	0.00002
D-Ácido Pantotenico	0.00002
Pyridoxina.HCl	0.00002
Riboflavina	0.00002
Tiamina.HCl	0.00002
D(-)-Fructosa	0.4
Ácido Fumarico	0.055
D(+)-Glucosa	0.7
α -Ácido cetoglutárico	0.37
L(-)-Ácido Mállico	0.67
Ácido Succinico	0.06
Sacarosa	26.68

Fuente: Catálogo Sigma 2001-2003

ANEXO 2. Componentes del Medio de Cultivo L15

Componentes	(g/l)
Cloruro de Calcio 2H ₂ O	0.185
Cloruro de Magnesio (anhidro)	0.09366
Sulfato de Magnesio (anhidro)	0.09767
Cloruro de Potasio	0.4
Fosfato de Potasio Monobasico	0.06
Cloruro de sodio	8.0
Fosfato de Sodio Dibasico	0.19
DL-Alanina	0.45
L-Arginina (Libre de base)	0.5
L-Asparagina (anhidro)	0.25
L-Cisteina (libre de base)	0.12
L-Glutamina	0.3
L-Glicina	0.2
L-Histidina	0.25
DL-Isoleucina	0.25
L-Leucina	0.125
L-Lisina	0.075
DL-Metionina	0.15
DL-Fenilalanina	0.25
L-Serina	0.2
DL-Treonina	0.6
L-Triptofano	0.02
L-Tirosina (libre de base)	0.3
DL-Valina	0.2
Cloruro de Colina	0.001
Flavin Mononucleotide.Na	0.0001
Ácido Fólico	0.001
Myo-Inositol	0.002
Niacinamida	0.001
DL-Ácido pantónico	0.001
Piridoxine.HCl	0.001
Monofosfato de tiamina HCl	0.001
D-Galactosa	0.9
Fenol Red. Na	0.011
Ácido pirúvico Na	0.55

Fuente: Catálogo Sigma 2001-2003

ANEXO 3. Componente del medio de cultivo RPMI

Componente	g/l
NaPO ₄	0.8
MgSO ₄	0.04884
KCl	0.4
NaCl	6.0
FeNO ₃ 4H ₂ O	0.1
L-Arginina	0.2
L-Cistina 2HCL	0.0652
L-Ácido Glutámico	0.02
L- Glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-Prolina	0.02
L-isoileucina	0.05
L-Leucina	0.05
L-Lisina HCl	0.04
L-Meteonina	0.015
L-Fenilalanina	0.015
L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03
DL-Valina	0.02
L-Treonina	0.02
L-Triptófano	0.0005
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	0.02883
D-Glucosa	2.0
D-Biotina	0.0002
L-Asparagina	0.05
Ácido p-aminobenzoico	0.001
Ácido L-Aspartico	0.02
Ácido D-Pantótenico	0.00025
Ácido Fólico	0.001
Cloruro de Colina	0.003
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Myo-inositol	0.035
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Glutatione reducido	0.001
HEPES	5.958
Rojo Fenol Na	0.0053

ANEXO 4. Composición del medio de cultivo NNN para *Leishmania* sp.

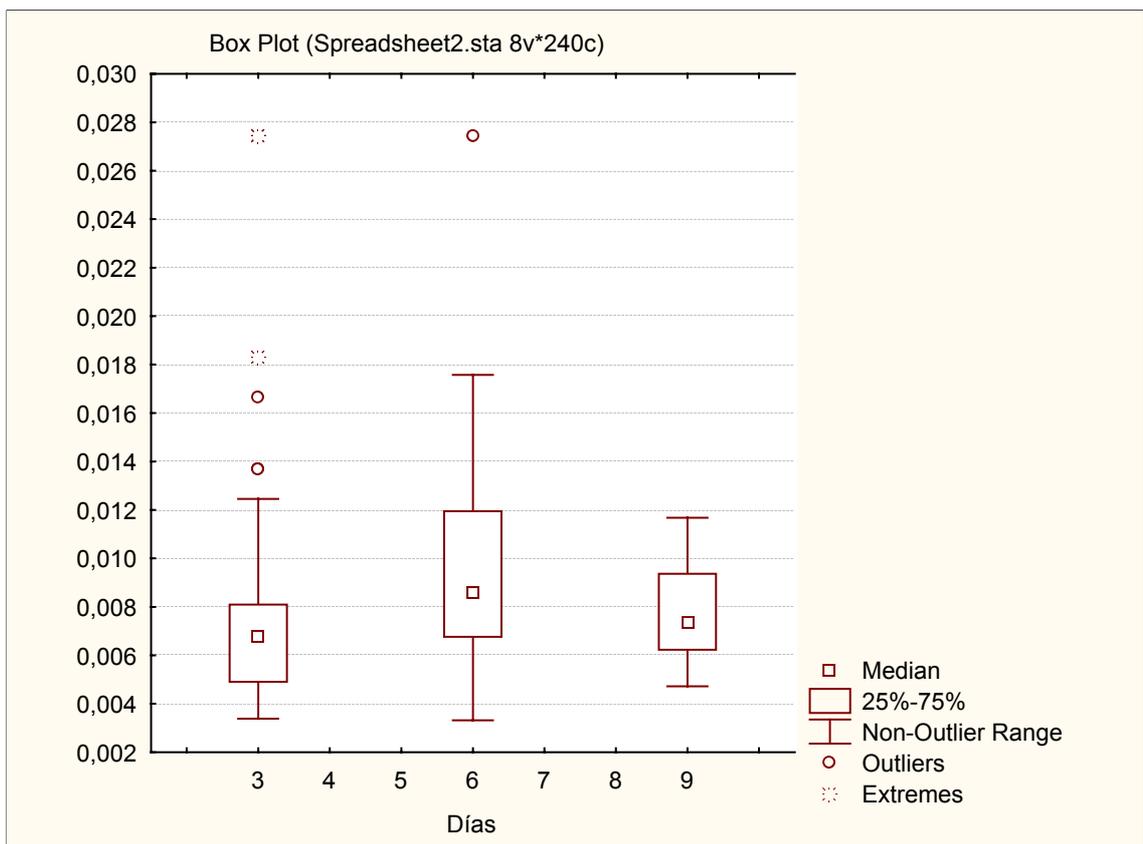
Componentes	g/100ml
Agar nutritivo	1.80
NaCl	0.60
Glucosa	0.60
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0.006
KH ₂ PO ₄	0.006
Infusión de cerebro corazón (BHI)	2.12
Agua destilada estéril	100 ml

ANEXO 5. Composición del medio de cultivo Schneider's

Componente	g/l
NaPO ₄	0.7
NaHCO ₃	0.4
MgSO ₄	1.80221
KCl	1.6
NaCl	2.1
CaCl ₂	0.6
K ₂ PO ₄	0.45
Extracto de Levadura	2.0
L-Arginina	0.6
Beta -Alanina	0.5
L-Cisteina 2HCl	0.026732
L-Glutamina	1.8
Glicina	0.25
L-Histidina	0.4
L-Isoleucina	0.15
L-Leucina	0.15
L-Metionina	0.15
L- Prolina	1.7
L- Serina	0.25
DL-Valina	0.3
L- Treonina	0.35
L-Triptófano	0.1
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	0.720199
D-Glucosa	2.0
D-Trehalosa	2.0
Ácido Glutámico	0.8
Ácido -L -Aspártico	0.4
Ácido -L-Malico	0.6
Ácido α Cetoglutámico	0.35
Ácido Succínico	0.06
Ácido Fumárico	0.06
L-Lisina	1.65

ANEXO 6. Kruskal Wallis para la infección de *Ae. aegypti* / *L. braziliensis* comparado con los días 3, 6 y 9.

Media, Overall Median = ,0073397				
Variable independiente: DIAS				
Chi-Cuadrado = 12,20631, df = 2, p = ,0022				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Media: observado	55	15	11	81
Esperado	45,6644287	24,4630871	10,8724833	
obs.-esp.	9,33557129	9,46308708	0,12751675	
Media: observado	29	30	9	68
Esperado	38,3355713	20,5369129	9,12751675	
obs.-esp.	9,33557129	9,46308708	0,12751675	
Total: observado	84	45	20	149



ANEXO 7. Kruskal Wallis para la infección de J774/ *L. braziliensis* comparado con los días 3, 6 y 9.

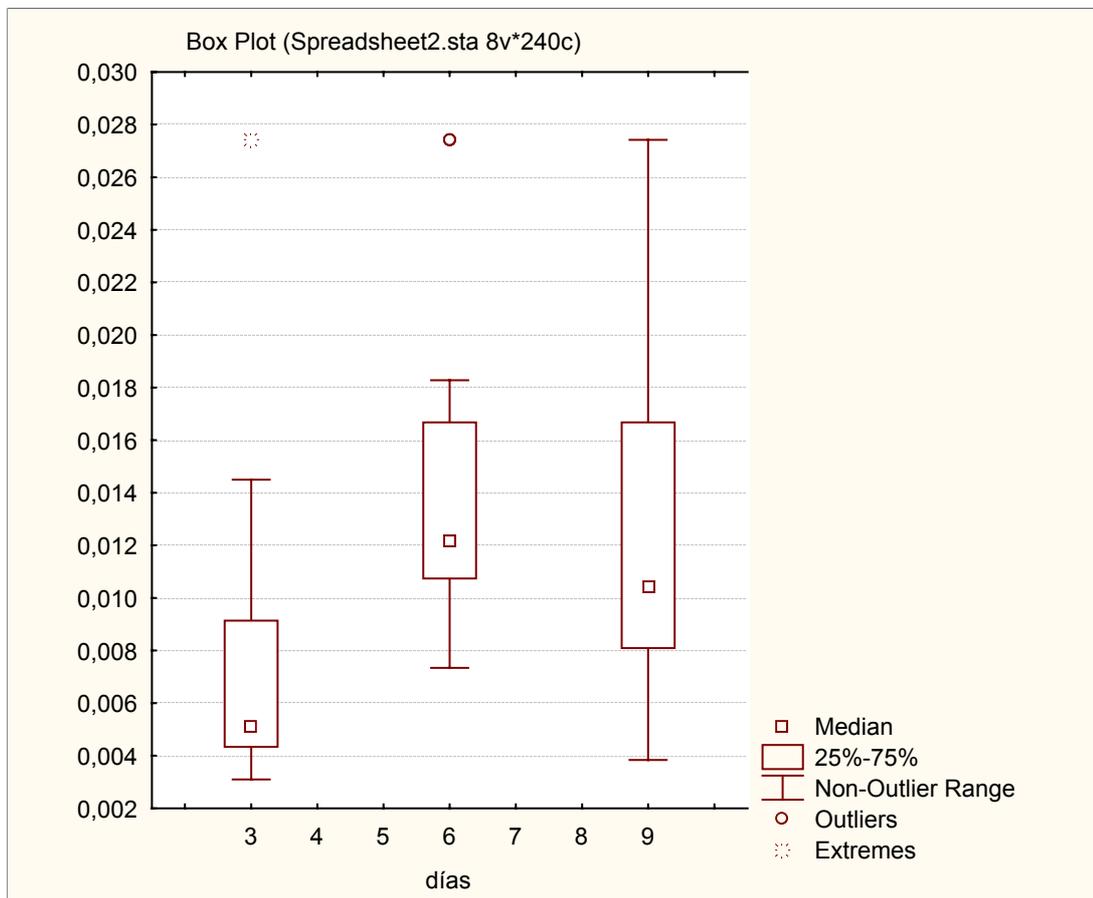
Media, Overall Median = ,0091385

Variable independiente: DIAS

Chi-Square = 65,67030, df = 2,

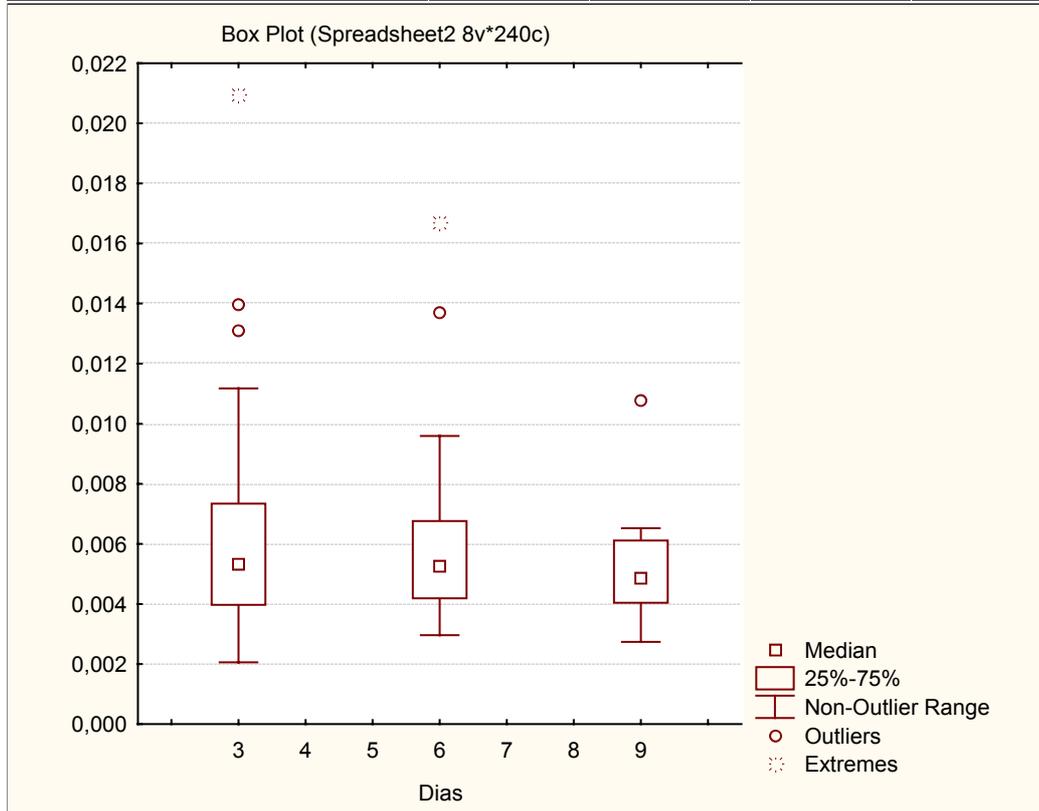
p = ,0000

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Median: observado	68	8	12	88
esperado	42,6163521	18,8176098	26,5660381	
obs.-esp.	25,3836479	-10,8176098	-14,5660381	
Median: observado	9	26	36	71
esperado	34,3836479	15,1823902	21,4339619	
obs.-esp.	-25,3836479	10,8176098	14,5660381	
Total: observado	77	34	48	159



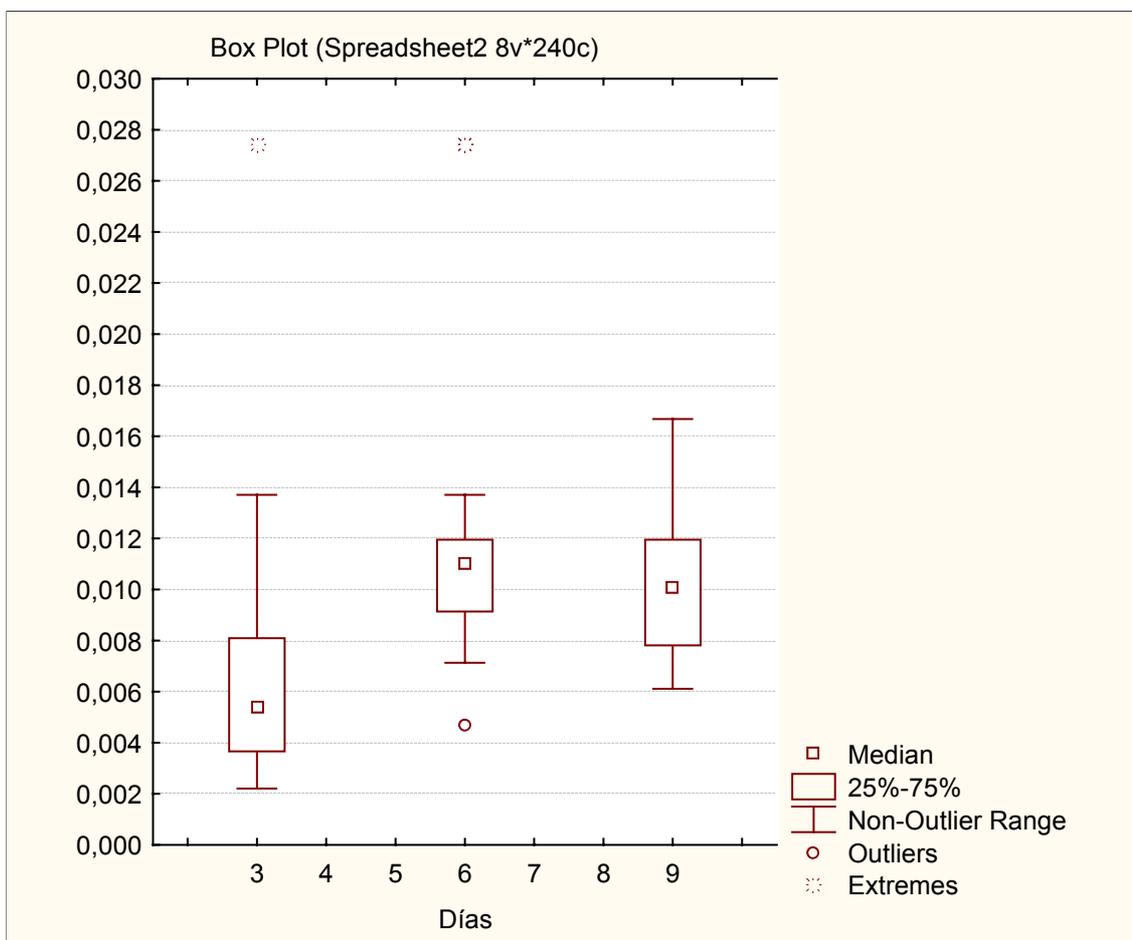
ANEXO 8. Kruskal Wallis para la infección de *Ae. aegypti* / *L. chagasi* comparado con los días 3, 6 y 9.

Media , Overall Media = 0052244				
Variable independiente: DIAS				
Chi-Cuadrado = 3,037590, df = 2, p = ,2190				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Media: observado	92	18	12	122
Esperado	94,8888855	18,5761318	8,53497982	
obs.-esp.	-2,8888855	0,57613182	3,46502018	
Median: observado	97	19	5	121
Esperado	94,1111145	18,4238682	8,46502018	
obs.-exp.	2,8888855	0,57613182	3,46502018	
Total: observado	189	37	17	243



ANEXO 9. Kruskal Wallis para la infección de J774 / *L. chagasi* comparado con los días 3, 6 y 9.

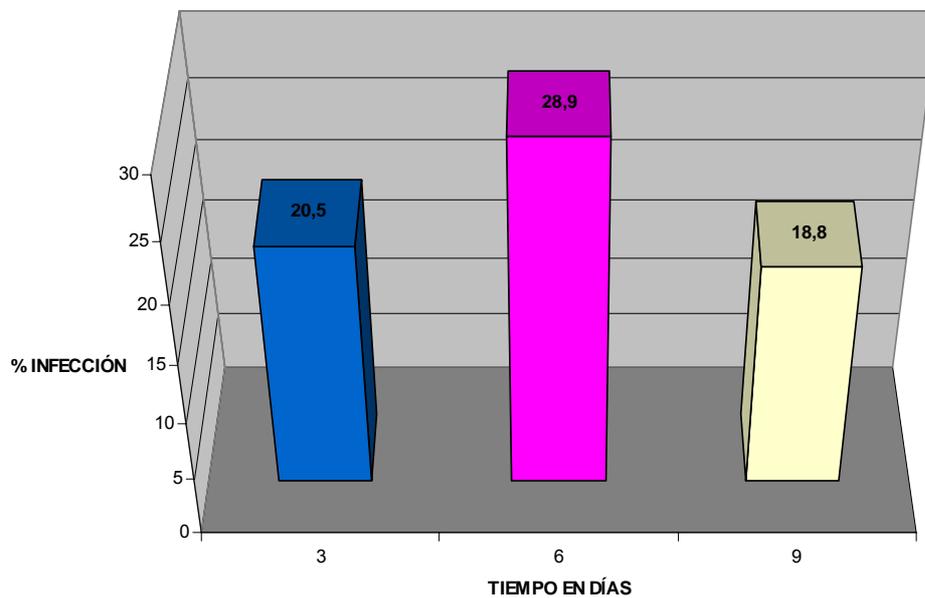
Media. Overall Median = ,0080922				
Variable independiente: DIAS				
Chi-Cuadrado = 34,19389, df = 2, p = ,0000				
	Grupo 1	Group 2	Group 3	Total
Media: observado	45	5	10	60
Esperado	29,73913	15,130435	15,130435	
obs.-esp.	15,26087	-10,130435	5,13043499	
Media: observado	12	24	19	55
Esperado	27,26087	13,869565	13,869565	
obs.-esp.	-15,26087	10,130435	5,13043499	
Total: observado	57	29	29	115



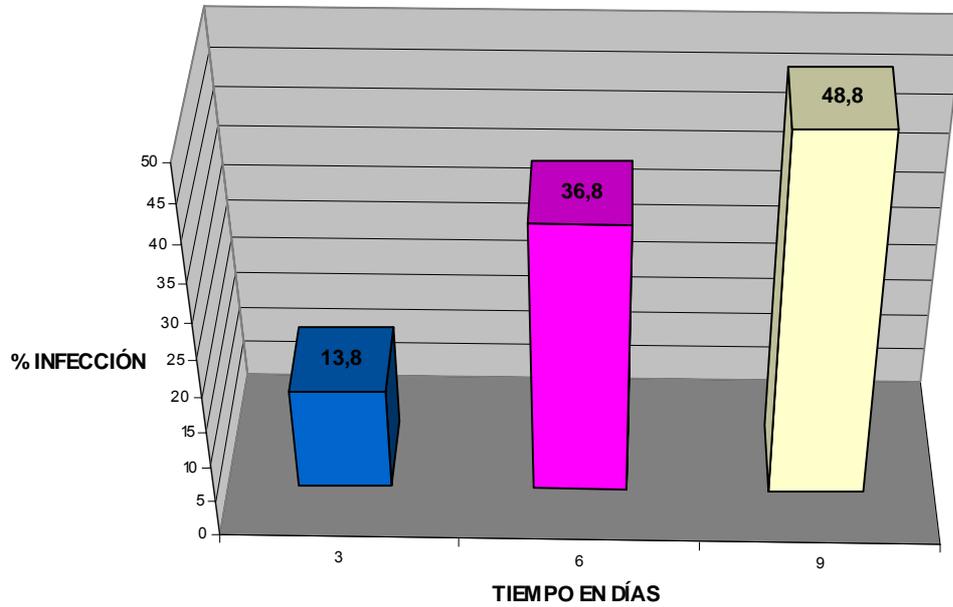
ANEXO 10. Valor P de la prueba U (Mann Whitney) para los cultivos infectados con *L. braziliensis* y *L. chagasi*.

Cultivo celular	Parásito	Variable Días	Cultivo celular	Valor P	Diferencias significativas
<i>Ae. aegypti</i>	<i>L. braziliensis</i>	3 - 6 - 9	<i>Ae. aegypti</i>	0,002058*	3 - 6
J774	<i>L. braziliensis</i>	3 - 6 - 9	J774	0,0000**	3 - 6 y 9
J774	<i>L. chagasi</i>	3 - 6 - 9	J774	0,0000**	3 - 6 y 9

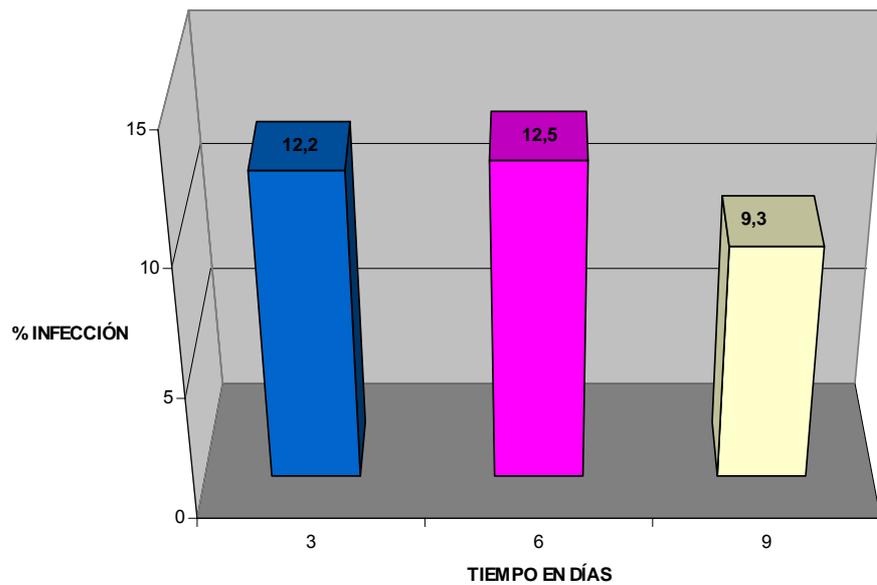
ANEXO 11. Promedio del porcentaje de infección de las células de *Ae. aegypti* con *L. braziliensis* en los días indicados.



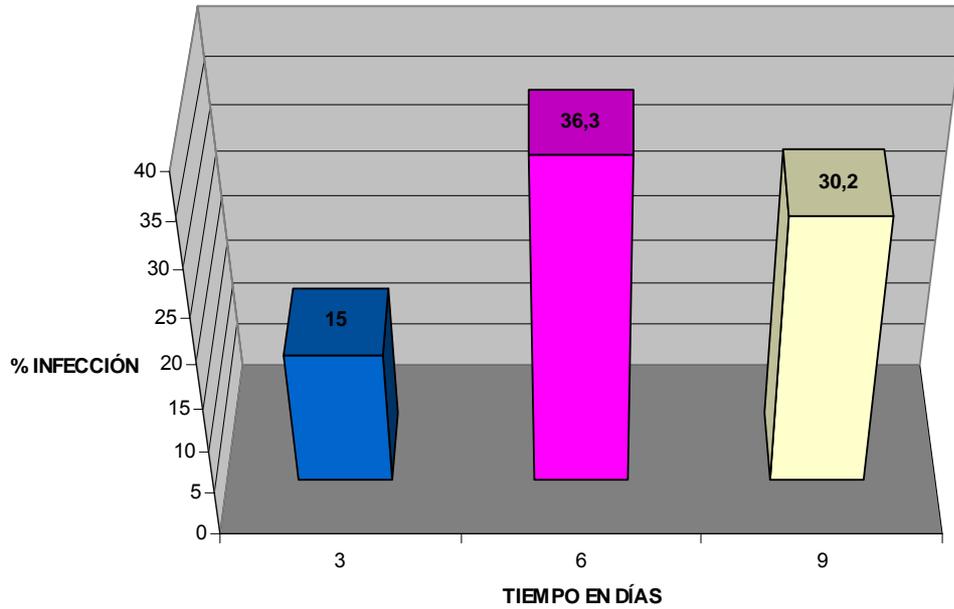
ANEXO 12. Promedio del porcentaje de infección en las células de J774 con *L. braziliensis* en los días indicados.



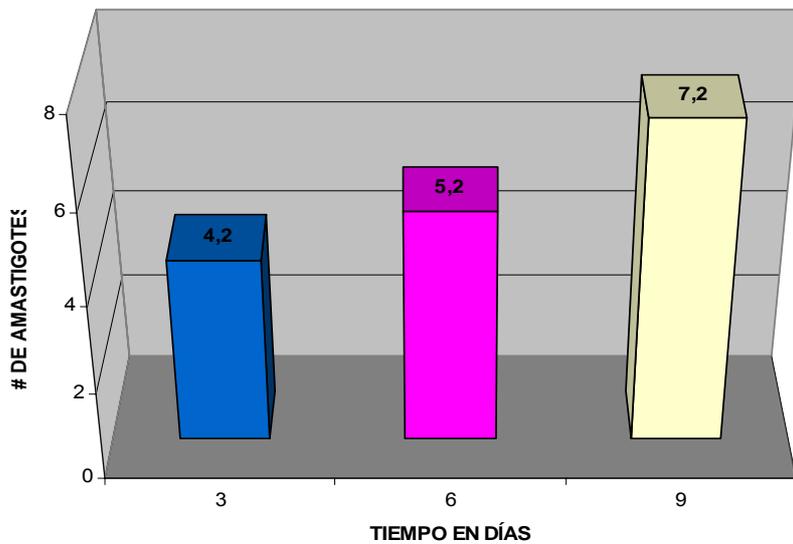
ANEXO 13. Promedio del porcentaje de infección de las células de *Ae. aegypti* con *L. chagasi* en los días evaluados.



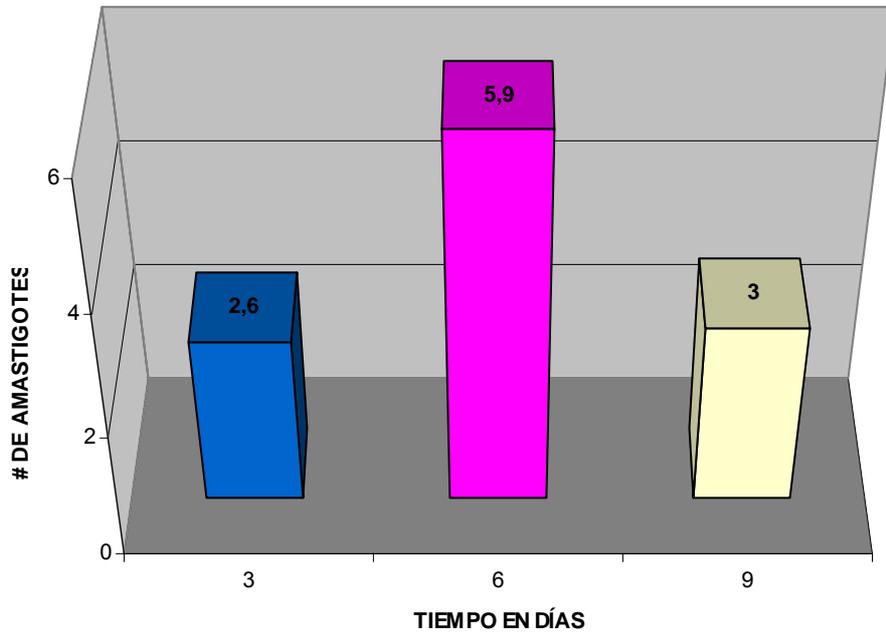
ANEXO 14. Promedio del porcentaje de infección en las células J774 con *L. chagasi* en los días evaluados.



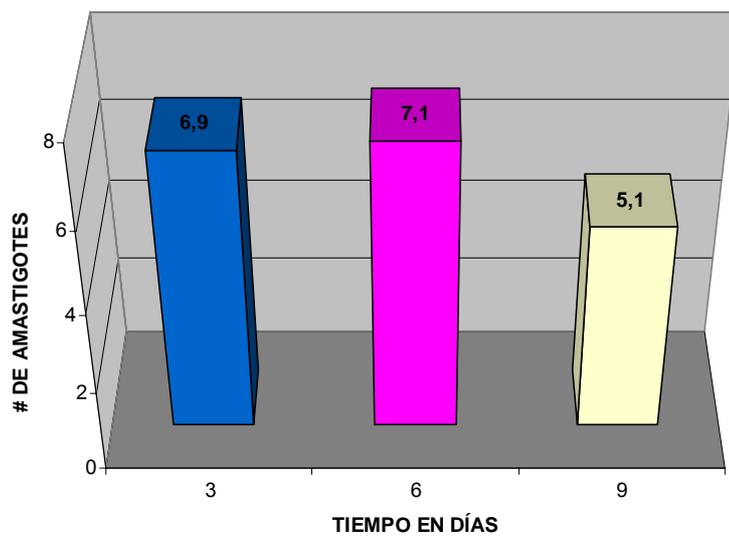
ANEXO 15. Promedio del número de amastigotes de *L. braziliensis* por célula, observados en el cultivo de *Ae. aegypti* en los día post-infección indicados.



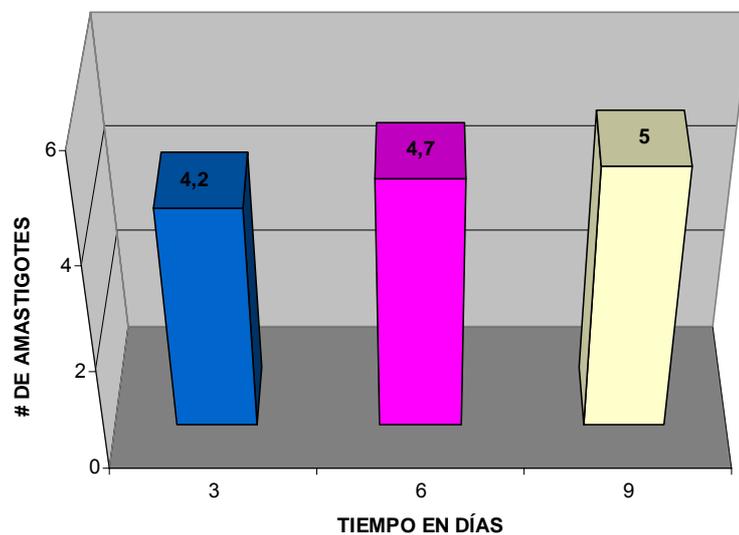
ANEXO 16. Promedio del número de amastigotes de *L. braziliensis* por célula, observados en la línea celular J774 en los días post-infección indicados.



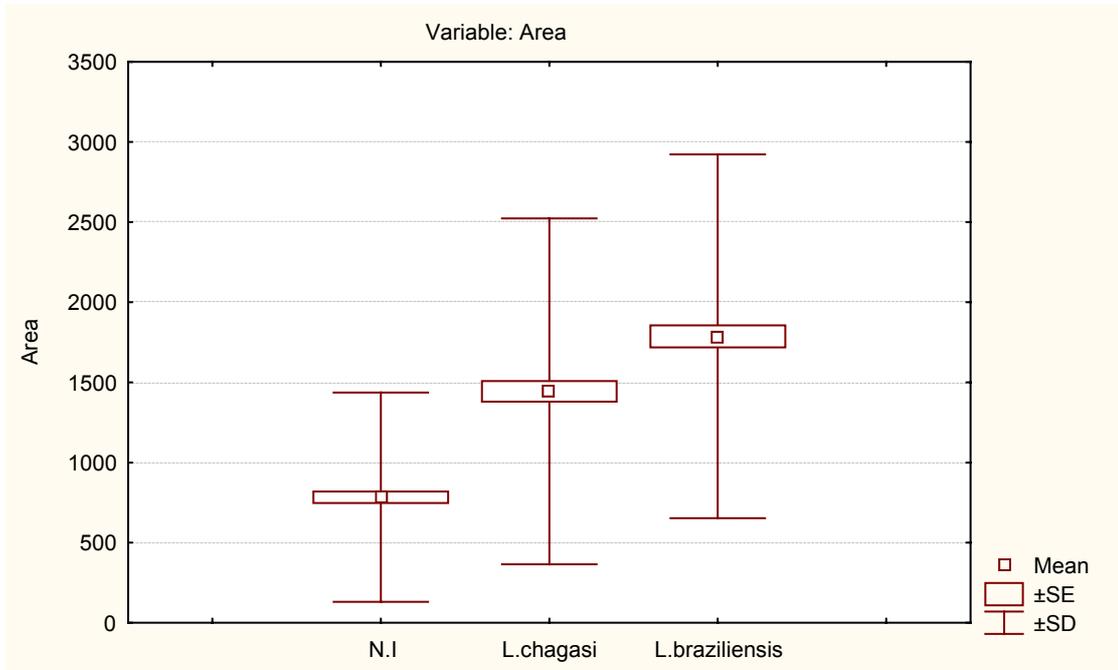
ANEXO 17. Promedio de amastigotes de *L. chagasi* por célula, observados en el cultivo de *Ae.aegypti* en los días post-infección indicados.



ANEXO 18. Promedio de amastigotes de *L. chagasi* por célula observados en la línea celular J774 en los días post-infección indicados.



ANEXO 19. Prueba Kruskal Wallis para el análisis morfométrico de las células de *Ae. aegypti* no infectadas y las células infectadas con *L. chagasi* y *L. braziliensis* en los días 3, 6 y 9 post-infección.



ANEXO 20. Prueba U de Mann Withney para la comparación entre células de *Ae. aegypti* no infectadas y las infectadas con *L. chagasi* y *L. braziliensis*

Área (µm²) p= <0.05		
N.I - <i>L. chagasi</i>	N.I - <i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i> - <i>L. braziliensis</i>
p=0.00000	p= 0.00000	P= 0.029693

N.I= células de *Ae. aegypti* no infectadas
L. braziliensis= Células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. braziliensis*
L. chagasi= Células de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chagasi*

ANEXO 21. Histograma de frecuencia de las células de *Ae. aegypti* no infectadas y las infectadas con *L. chagasi* y *L. braziliensis*

Días	Rangos	<i>Ae.aegypti</i>		
		No infectadas	<i>Ae.aegypti-L.chagasi</i>	<i>Ae. aegypti-L.braziliensis</i>
3	200-400	0	2	0
3	400-600	2	0	5
3	600-800	13	19	6
3	800-1000	22	37	5
3	1000-1200	22	28	7
3	1200-1400	17	33	5
3	1400-1800	2	22	9
3	1800-2000	1	27	8
3	2000-2200	1	9	1
3	2200-2400	0	13	2
3	>2400	0	14	31
6	200-400	5	0	1
6	400-600	12	1	0
6	600-800	12	5	3
6	800-1000	15	0	5
6	1000-1200	11	2	6
6	1200-1400	1	4	12
6	1400-1800	5	4	3
6	1800-2000	5	8	9
6	2000-2200	2	3	5
6	2200-2400	1	1	6
6	>2400	5	10	28
9	200-400	0	0	2
9	400-600	0	0	1
9	600-800	1	2	3
9	800-1000	8	1	8
9	1000-1200	10	2	9
9	1200-1400	5	5	8
9	1400-1800	13	2	2
9	1800-2000	13	4	8
9	2000-2200	4	2	10
9	2200-2400	1	4	4
9	>2400	0	17	23