

Parásitos intestinales

LEISHMANIA

Caracterización del crecimiento *in vitro* de promastigotes de cinco especies de referencia de *Leishmania* de la Organización Mundial de la Salud

Carolina Camargo¹, Carlos Esteban Franco^{1,2}, Clemencia Ovalle¹

¹ Grupo de Dermatología Tropical, Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, Bogotá, D.C., Colombia

² Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores, Colciencias, Bogotá, D.C, Colombia

Introducción. Las cepas de referencia de *Leishmania* spp. de la Organización Mundial de la Salud se utilizan desde 1972 en investigaciones de leishmaniasis; éstas se cultivan, amplifican y crioconservan sin conocer información relevante como su cinética de crecimiento.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la curva de crecimiento y viabilidad celular de cinco especies de referencia de la OMS, y determinar si existen cambios en la curva de crecimiento durante diferentes pases de cultivo.

Metodología. Se evaluaron las cepas de referencia: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94), *L. guyanensis* (MHOM/GF/79/LEM85), *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) y *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL 21). La curva de crecimiento se hizo en los pases de cultivo 1, 5 y 10 mediante el conteo diario de los parásitos y la medición de su porcentaje de viabilidad con la tinción de yoduro de propidio y el programa *CellProfiler* en cada pase. Este seguimiento se hizo hasta alcanzar un valor de viabilidad cercano a cero.

Resultados. Las especies del subgénero *Leishmania* alcanzaron su máximo crecimiento *in vitro* en cada uno de los pases analizados entre los días 3 y 4, mientras que, las del subgénero *Viannia*, entre los días 6 y 7. Una vez finalizada la fase logarítmica, la viabilidad disminuyó hasta alcanzar valores cercanos a 0 %, tardando entre 4 y 5 días para el subgénero *Leishmania* y entre 7 y 8 días para subgénero *Viannia* en los pases 1, 5 y 10. No hubo diferencias entre los pases de cultivo 5 y 10, pero sí entre estos dos pases con el 1.

Conclusiones. Los resultados obtenidos demuestran diferencias en la cinética de crecimiento y

viabilidad entre los subgéneros *L. Viannia* y *L. Leishmania*, pero no entre las especies de cada subgénero.

• • •

Generación de líneas celulares fluorescentes para el establecimiento de un modelo de infección *in vitro* para *Leishmania* spp.

David H. Sánchez, Sergio A. Pulido, Iván D. Vélez, Sara M. Robledo

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Introducción. Los parásitos protozoos del género *Leishmania* spp. son responsables de la leishmaniasis, la cual es una enfermedad parasitaria que afecta alrededor de 15 millones de personas y 350 millones más están en riesgo a lo largo de 88 países. Lo anterior ha conllevado a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean de bajo costo, capaces de eliminar al parásito en sus estadios intracelulares (amastigotes) y extracelulares (promastigotes), y que no generen toxicidad en las células del episoema.

Por lo anterior, el desarrollo de metodologías automatizadas en los ensayos de viabilidad, junto con la transfección de genes fluorescentes, ha resultado muy útil para vigilar la progresión de infecciones dentro de macrófagos y tejidos huésped, y la cuantificación rápida y sensible en pruebas de citotoxicidad de medicamentos por medio de la fluorometría.

Materiales y métodos. La línea celular humana U937 es cotransfectada con los vectores pTandem-1 y pTK-neo, el cual permite una integración estable dentro de las células mediante un promotor llamado cinasa de timidina. Para los ensayos *in vivo* se utilizó la citometría de flujo con la finalidad de generar poblaciones estables y fluorescentes.

Resultados. Se generó una línea celular fluorescente mediante una transfección estable con la proteína fluorescente Ds-RFP. El cultivo resultante expresa la secuencia del gen como proteína citoplasmática. La línea celular DsRFP-U937 está lista para ser aplicada en estudios celulares *in vitro*, gracias a su estabilidad y sus

elevados niveles de expresión, lo cual permite simplificar la interpretación de resultados.

Conclusiones. La línea celular DsRFP-U937 se ha desarrollado para su uso como modelo celular *in vitro* para estudios de investigación.

• • •

Validación de una técnica con yoduro de propidio para determinar la viabilidad y cinética de crecimiento en cultivos de promastigotes de *Leishmania infantum*

Diana Alexandra Londoño¹, Diana Vanegas¹, Carlos Franco¹, Juan Lugo¹, Consuelo López², Carlos Arturo Clavijo^{1,2}

¹ Grupo Modelamiento y Control de Sistemas Biológicos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El uso del hemocitómetro es el método más común para determinar las concentraciones celulares, pero está influenciado por la subjetividad del observador. Utilizando yoduro de propidio como marcador fluorescente y el programa *CellProfiler* para analizar imágenes, se validó una técnica para determinar de manera rápida y objetiva la concentración celular de cultivos de parásitos de *Leishmania infantum*, evaluando parámetros de cinética de crecimiento y viabilidad.

Metodología. Se elaboró una curva de crecimiento cultivando promastigotes de *L. infantum* procedentes

de un aislamiento colombiano. Se determinó la concentración de parásitos no viables incubando 100 µl de suspensión de parásitos con yoduro de propidio (500 nM) durante cinco minutos a temperatura ambiente y la concentración total de parásitos se obtuvo incubando la misma muestra durante tres minutos en baño de María a 80 °C. Se adquirieron imágenes bajo microscopio de epifluorescencia y, mediante su análisis con el programa *CellProfiler*, se estimó la concentración de parásitos no viables y totales. Para evaluar la reproducibilidad de la técnica y concentración mínima detectada, se hicieron tres conteos ciegos con yoduro utilizando diluciones seriales de parásitos cuya concentración también fue determinada por hemocitómetro. Se hizo un análisis de medidas repetidas utilizando el índice de Tukey para comparar ambos métodos.

Resultados. Hay diferencias estadísticamente significativas en la determinación de las concentraciones de las diluciones evaluadas al comparar el hemocitómetro con la técnica de yoduro ($p=0,021$). No hay diferencias significativas en el seguimiento de la cinética de crecimiento de un cultivo con las técnicas utilizadas ($p=0,1632$).

Conclusiones. La técnica con yoduro proporciona un valor de viabilidad poco reportado para *Leishmania* spp. y es útil para determinar de forma rápida y objetiva la cinética de crecimiento de cultivos en comparación con la determinación mediante hemocitómetro.

• • •