

CAPACIDAD INFECTIVA DE PROMASTIGOTES EN FASE ESTACIONARIA DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*, EN LÍNEA CELULAR DH82

Karen Daphne Calvay-Sánchez^{1,a}, Nyshon Máximo Rojas-Palomino^{2,a}, Aidé Clorinda Sandoval-Juarez^{2,b}, Alberto Cisneros-Tarmeño^{3,c}, Cristian Obregón-Cahuaya^{4,d}, Gloria Sonia Minaya-Gómez^{2,e}

RESUMEN

Objetivos. Determinar la capacidad infectiva de los promastigotes de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* en la línea celular macrófago-monocítica de *Canis familiaris* DH82. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio experimental durante los meses de enero a diciembre de 2013. Se utilizaron cepas referenciales de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/PE/84/LC53 y *Leishmania (V.) peruviana* MHOM/PE/84/LC26. La línea celular fue infectada con promastigotes en fase estacionaria y la capacidad infectiva fue determinada como el producto del porcentaje de macrófagos infectados por el promedio de amastigotes por macrófago infectado, observado al microscopio de epifluorescencia. **Resultados.** El 13% de formas metacíclicas para *Leishmania (V.) braziliensis* correspondió al día 17,5 posinoculación y para *Leishmania (V.) peruviana* un porcentaje de 9,5% en el día 14,5. No se encontró diferencia significativa entre la capacidad infectiva de los promastigotes en fase estacionaria de ambas especies. **Conclusiones.** Se recomienda evaluar la capacidad infectiva de los promastigotes metacíclicos de cepas de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* en líneas celulares, a fin de determinar el modelo de infección *in vitro* más adecuado, que permita efectuar estudios de susceptibilidad a las drogas leishmanicidas de mayor eficacia para el control de la enfermedad.

Palabras clave: Leishmaniasis; Virulencia; Línea celular, *Leishmania braziliensis* (fuente: DeCS BIREME).

INFECTIVITY OF PROMASTIGOTES IN STATIONARY PHASE OF *Leishmania (Viannia) braziliensis* AND *Leishmania (Viannia) peruviana*, IN CELL LINE DH82

ABSTRACT

Objectives. To determine the infectivity of promastigotes of *Leishmania (V.) peruviana* and *Leishmania (V.) braziliensis* in monocyte-macrophage cell line DH82 of *Canis familiaris*. **Materials and methods.** Was conducted a experimental study during the months of January to December 2013. Were used strains of *Leishmania* were used (*V.) braziliensis* MHOM / PE / 84 / LC53 and *Leishmania (V.) peruviana* MHOM / PE / 84 / LC26. The cell line was infected with stationary phase promastigotes and infectivity was determined as the product of percent infected macrophages average amastigotes per macrophage observed in epifluorescence microscope. **Results.** 13% of metacyclic forms to *Leishmania (V.) braziliensis* corresponded to 17.5 days post inoculation and *Leishmania (V.) peruviana* a percentage of 9.5% on the day 14.5. No significant difference was found between infectivity of stationary phase promastigotes of both species. **Conclusions.** It is recommended assess the infectivity of metacyclic promastigotes peruviana strains of *Leishmania (V.)* and *Leishmania (V.) braziliensis* cell lines in order to determine the most appropriate model *in vitro* infection, allowing leishmanicidas make the drug more effective susceptibility studies for disease control.

Key words: Leishmaniasis; Virulence; Cell line, *Leishmania braziliensis* (source: MeSH NLM).

¹ Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

² Laboratorio de Leishmaniasis, Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú

³ Laboratorio de cultivo celular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

⁴ Unidad de Análisis y Generación de Evidencias en Salud Pública. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

^a Biólogo microbiólogo; ^b biólogo; ^c médico veterinario; ^d licenciado en Estadística; ^e biólogo, máster en Medicina Tropical y Salud Internacional
Recibido: 19-08-14 Aprobado: 04-03-15

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad metaxénica parasitaria que afecta aproximadamente a 12 millones de personas en el mundo, y que se manifiesta con formas clínicas variadas como la leishmaniosis cutánea, leishmaniosis mucosa y la leishmaniosis visceral ⁽¹⁾. Se ha reportado en 98 países y se ha estimado un total de 0,2 a 0,4 millones de casos por año para la leishmaniosis visceral y 0,7 a 1,2 millones de casos estimados por año para las formas cutáneas de la enfermedad, siendo de Afganistán, Argelia, Irán, Etiopía, Norte de Sudan, Siria, Brasil, Colombia, Costa Rica y Perú los países que reportan entre el 70 a 75% de la incidencia global estimada para esta forma clínica ⁽²⁾; en el Perú se ha reportado en los últimos 5 años, más de 6 mil casos por año, lo cual representa aproximadamente el 9,6% de casos reportados en América ⁽³⁾; es la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis ⁽¹⁾.

La virulencia es el grado de patogenicidad, inherente de un agente infeccioso, para causar o infringir daño a una persona bajo condiciones clínicas ^(4,5), y que involucra diversos factores como los microbiológicos, patológicos y genéticos ⁽⁵⁾, en el caso de los parásitos intracelulares como *Leishmania*, la virulencia está relacionada, además, con la capacidad de sobrevivencia, la diferenciación y la multiplicación en condiciones adversas del fagolisosoma de los macrófagos del hospedador vertebrado ⁽⁶⁾, el cual contiene enzimas proteolíticas que pueden matar o digerir al parásito; si el parásito logra evadir esta respuesta, se multiplica en el macrófago, provocando su lisis y liberándose como amastigote, siendo posteriormente, fagocitados por otros macrófagos, células dendríticas y dentro de fibroblastos ^(7,8), mientras que la capacidad infectiva o infectividad es un término que define a la capacidad de un microorganismo para ingresar, diseminarse y reproducirse o multiplicarse al interior de un hospedero ya sea a nivel celular, de tejido u órganos ^(9,10); anteriormente esta cualidad del microorganismo fue definido como "agresividad", término que entró en desuso debido al significado amplio e inespecífico que representa ^(11,12).

El género *Leishmania*, presenta durante su ciclo dos formas evolutivas: el estadio amastigote, forma no flagelada presente en los macrófagos del hospedero mamífero y el estadio promastigote, forma flagelada presente en el vector ⁽¹³⁾ y que involucra a varias especies del género *Lutzomyia*; son las hembras hematófagas quienes mediante la picadura de un hospedero mamífero se infectan al ingerir las formas amastigotes junto con la sangre; y es en el intestino medio del vector donde los amastigotes se convierten de la forma no flagelada

o inmóvil a la forma flagelada como consecuencia del cambio de condiciones de pH y temperatura ⁽¹⁴⁾; se multiplican rápidamente por división binaria y a los pocos días, inician el proceso de migración hacia el intestino medio torácico y a la válvula cardíaca, adhiriéndose a las microvellosidades del esófago y la faringe, por medio de su flagelo; en este proceso, el parásito sufre cambios genéticos, bioquímicos y morfológicos ⁽¹⁴⁾. Esta migración tiene consecuencias adversas en el vector, principalmente en el proceso de ingesta de la sangre, debido al bloqueo de las válvulas estomodeal y cardíaca, además del intestino medio por la acumulación de un gel rico en carbohidratos que es formado por los productos de secreción del parásito, que permite la acumulación de un mayor número estos; debido a que estas válvulas se encuentran bloqueadas, el insecto vector debe realizar más de un intento de succión durante la picadura y cuando lo logra, se permite el flujo en ambas direcciones de la sangre, del mamífero hacia el vector y de los parásitos del vector hacia el mamífero ⁽¹⁴⁾.

El proceso de metaciclogénesis es la transformación de amastigotes a promastigotes avirulentos o no infectivos (procíclicos) y de estos en promastigotes virulentos (metacíclicos); tiene lugar en el intestino medio del vector con una duración de 10 a 11 días, de los cuales requiere de 3 días para el cambio de amastigotes a promastigotes avirulentos y de 7 a 8 días para la transformación de estos a promastigotes virulentos, otras investigaciones señalan que el proceso de metaciclogénesis puede alcanzar una duración de diez a catorce días ^(13,15).

Para lograr una aproximación de los procesos involucrados en la infección natural, los estudios de infección *in vitro* de *Leishmania* requieren de la obtención de los promastigotes metacíclicos, estadio que cuenta con mayor virulencia en comparación con los promastigotes procíclicos ^(16,17) por la presencia de glicoproteínas, principalmente la glicoproteína 63 (gp63) ⁽¹³⁾, que es una metaloproteasa de zinc abundante en la superficie de los promastigotes. Otros estudios realizados en el subgénero *Leishmania*, revelan que durante la metaciclogénesis, el lipofosfoglicano (LPG), un glicolípido presente también en la superficie de los promastigotes del parásito que interactúa con la superficie epitelial del intestino medio permitiendo su adhesión, sufre modificaciones estructurales en sus cadenas laterales que involucran a monosacáridos, en el caso de *Leishmania (L.) major* involucra a una hexosa (galactosa) y a una pentosa (arabinosa) ⁽¹⁸⁾, y en *L. (V.) braziliensis*, se ha reportado que el LPG se encuentra en menor cantidad en comparación a las especies del subgénero *Leishmania*, pero al igual que en estas, las formas promastigotes cuentan con una

mayor proporción de estas moléculas en comparación de las formas metacíclicas. Mediante pruebas inmunohistoquímicas se demostró que el LPG en las formas promastigotes procíclicas y metacíclicas que se encuentran adheridas al epitelio del intestino medio del vector, cuentan con residuos de $\beta(1,3)$ glucosa; otras modificaciones que han sido involucradas en esta interacción del parásito con el vector son la galactosa, la manosa y la glucosa^(19,20). La transformación de promastigotes procíclicos a metacíclicos involucra modificaciones bioquímicas, moleculares y genéticas que proporcionan al promastigote metacíclico resistencia a la lisis mediada por el complemento^(21,22), facilitan el proceso de fagocitosis por los macrófagos⁽²²⁾, aseguran la supervivencia del parásito en condiciones adversas en el fagolisosoma del macrófago, inducen la formación de proteínas de la familia de las quinasas y regulan la producción del óxido nítrico en las vacuolas fagocitóforas^(20,23).

El objetivo de esta investigación fue determinar la capacidad infectiva de los promastigotes *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana* en fase estacionaria^(7,15,24), en condiciones *in vitro* en la línea celular DH82; así mismo, contribuir en la búsqueda de un modelo celular con fines de infección *in vitro* que permita realizar ensayos de susceptibilidad en formas amastigotes a drogas leishmanicidas y la evaluación de nuevas alternativas terapéuticas de bajo costo y menor toxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo experimental en los ambientes del Laboratorio de Leishmaniosis del Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, durante los meses de enero a diciembre de 2013.

Se utilizaron cepas referenciales de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/PE/84/LC53 y *Leishmania (V.) peruviana* MHOM/PE/84/LC26. Estas cepas criopreservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fueron descongeladas y cultivadas a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio Drosophila de Schneider's (Gibco–Life technologies) a pH 6,5 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBI) a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ y gentamicina (medio Schneider's completo pH de 7,0), conservándose por pasajes sucesivos cada 20 días.

CURVA DE CRECIMIENTO

Para obtener la curva de crecimiento, las cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana* fueron cultivadas en 2 mL de medio

Schneider's completo a una concentración de 5×10^2 parásitos/mL e incubados a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$, etapa que correspondió al punto inicial o T0 de la curva de crecimiento. El recuento de parásitos mediante cámara hematocitométrica, se efectuó cada 12 h, durante 18 días consecutivos.

RECUESTO DE FORMAS METACÍCLICAS

Se tomó una alícuota del cultivo de parásitos cada 12 h durante los 12 días de la fase estacionaria, se colorearon por tinción Giemsa, para determinar el día posinoculación con el mayor porcentaje de formas promastigotes metacíclicos, estas fueron definidas por la forma y proporción del cuerpo con el flagelo. Los recuentos de 100 parásitos se realizaron por duplicado.

LÍNEA CELULAR

Se utilizó la línea celular ATCC de macrófago de *Canis familiaris* DH82, proporcionada por el Área de Cultivo Celular del Instituto Nacional de Salud (INS), y que se encuentra criopreservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; esta línea celular fue descongelada, cultivada y mantenida en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 15% de SFBI más solución de antibiótico-antimicótico (medio MEM completo), a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en presencia de CO_2 al 5%, para el presente estudio se empleó la línea celular en fase logarítmica obtenidos a partir del cuarto pasaje.

INFECCIÓN IN VITRO

Los macrófagos para los del grupos control y de infección, obtenidos de la fase logarítmica, fueron depositados a una concentración de 4×10^4 cel/mL, sobre una laminilla de vidrio colocada en la base de los 24 pocillos de placas para cultivo celular; las placas fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h en presencia de CO_2 al 5%.

Los parásitos en fase estacionaria fueron colectados del medio Schneider's del día con el mayor porcentaje de las formas promastigotes metacíclicos; se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min, se lavaron en solución salina fisiológica (SSF) estéril tres veces, y fueron resuspendidos en medio MEM completo.

El ensayo de infección se realizó en dos grupos; en ambos, los parásitos fueron inoculados a 10, 15 y 20 parásitos/células aproximadamente, en el cultivo celular de macrófagos de 72 horas de incubación; las placas fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 5% de CO_2 . Luego de

24 h de infección, se retiró el primer grupo de laminillas de vidrio correspondiente al tiempo inicial o cero (T0) de infección; en el segundo grupo, el medio de cultivo conteniendo parásitos no internalizados en los macrófagos se retiró a las 24 h y se restituyó con medio MEM completo, y se incubó por otras 24 h a 37 °C, con 5% de CO₂, al término de los cuales se retiraron las laminillas correspondiendo al tiempo 1 (T1) de infección; en ambos grupos las laminillas fueron retiradas agregándosele suero humano con inmunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania*, posteriormente, se adicionó anti-IgG humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma), las láminas fueron observadas empleando microscopio de epifluorescencia (Axio Scope.A1 - CarlZeiss).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA

Se evaluaron 100 macrófagos por grupo (grupo control, grupo T0 y T1 de infección), se consideró el promedio de amastigotes por macrófago y el porcentaje de macrófagos infectados; para ello se empleó el objetivo de 100x en microscopio de epifluorescencia.

La determinación de la capacidad infectiva (CI), siguiendo lo reportado por Monzote *et al.* (25), corresponde al producto del promedio de amastigotes por macrófagos (Ø) infectados por el porcentaje de macrófago infectado.

ANÁLISIS DE DATOS

El promedio y la desviación estándar de los amastigotes por macrófago y el porcentaje de macrófagos infectados fueron determinados en el programa Microsoft Excel 2010; el análisis estadístico se realizó inicialmente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para determinar si la diferencia entre los resultados a diferentes proporciones de parásitos/célula era significativa ($p < 0,05$) seguido por la prueba de Wilcoxon para determinar si existía diferencia significativa entre *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana* ($p < 0,05$), empleando el programa estadístico R versión 3.1.2.

RESULTADOS

Las curvas de crecimiento obtenidas para *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana*, se observó, que la fase de latencia duró aproximadamente 24 h, iniciándose la fase exponencial temprana al segundo día posinoculación, la fase exponencial se prolongó hasta el día 6; a continuación, se observó que ambas especies entraron en fase estacionaria al día 7 extendiéndose por 12 días (Figura 1).

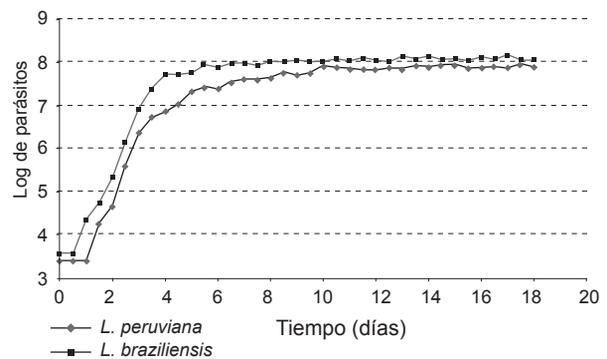


Figura 1. Curva de crecimiento de *Leishmania (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* en medio Schneider's a pH 7,0, con recuentos cada 12 h

Del recuento de parásitos de la fase estacionaria, se observó que *Leishmania (V.) braziliensis* alcanzó un máximo del 13% de formas metacíclicas a los 17,5 días posinoculación; y *Leishmania (V.) peruviana* alcanzó el 9,5% de formas metacíclicas a los 14,5 días, los obtención de promastigotes en fase estacionaria para los ensayos de infección, se realizó a partir de los días obtenidos con el mayor porcentaje de formas promastigotes metacíclicos determinados en la presente etapa.

INFECCIÓN IN VITRO

En la infección de los macrófagos de perro DH 82 con los promastigotes en fase estacionaria, la capacidad infectiva inicial (T₀) encontrada fue de 3 y 4,12 para *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana* respectivamente a diez parásitos/célula; en el tiempo 1, la capacidad infectiva para *Leishmania (V.) braziliensis* tuvo un incremento de 34,40 veces, el valor alcanzado fue de 102,89, mientras, en el caso de *Leishmania (V.) peruviana* la capacidad infectiva alcanzó un valor de 118,68, que corresponde a un incremento de 28,32 veces; a 15 y 20 parásitos/célula para *Leishmania (V.) braziliensis* el incremento de la capacidad infectiva fue de 4,2 y 4,9 respectivamente y para *Leishmania (V.) peruviana* la capacidad infectiva sufrió un incremento de 2,56 y 2,87 a las mismas proporciones (Tabla 1).

Los datos fueron analizados mediante la prueba Wilcoxon ($p < 0,05$) determinándose que no existe diferencia significativa entre ambas especies con relación a la capacidad infectiva de los promastigotes en fase estacionaria.

Tabla 1. Capacidad infectiva de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*

	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>						<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>					
	Tiempo 0 (T0)			Tiempo 1 (T1)			Tiempo 0 (T0)			Tiempo 1 (T1)		
	10 p/cel.	15 p/cel.	20 p/cel.	10 p/cel.	15 p/cel.	20 p/cel.	10 p/cel.	15 p/cel.	20 p/cel.	10 p/cel.	15 p/cel.	20 p/cel.
Porcentaje de Ø infectados	3	16	29	21,75	35	48,75	4	14,75	29,75	32,5	35,5	50,75
Promedio de Ø infectados	6±1,4	32±9,9	58±12,7	43,5±5	70±28,3	97,5±23,3	8±2,8	29,5±2,1	59,5±12,0	65±7,1	71±26,9	101,5±6,4
Promedio de amastigotes por Ø	1	1,67±0,4	2,3±0,1	4,7±3,4	3,21±0,4	6,7±0,3	1,03±0,2	3,87±1,7	4,75±0,1	3,59±0,2	3,27±0,6	8±0,2
Capacidad infectiva	3	26,72	66,7	102,23	112,35	327,11	4,12	57,08	141,31	116,09	114,45	406
Incremento con respecto al T0	-	-	-	34,08	4,2	4,9	-	-	-	28,32	2	2,87

Ø: macrófago
p/cel: parásitos/célula

DISCUSIÓN

El presente estudio permitió evaluar la capacidad infectiva en la línea celular ATCC de macrófago de *Canis familiaris* DH82, de las formas promastigotes de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*, obtenidos de la fase estacionaria; así mismo, se determinó que el mayor porcentaje (13%) de formas metacíclicas para *Leishmania (V.) braziliensis* correspondió al día 17,5 posinoculación y para *Leishmania (V.) peruviana* un porcentaje de 9,5% en el día 14,5. El 13% de formas metacíclicas observado en el presente estudio, es similar al porcentaje (12%) reportado por Zakai *et al.*,⁽²²⁾ quienes emplearon también el medio Schneider's suplementado al 20% de SFB, pH 7,0⁽²²⁾. El número de amastigotes por macrófagos y el número de macrófagos infectados fue determinado mediante la técnica de inmunofluorescencia directa, a

diferencia de trabajos anteriores, donde se empleó la tinción Giemsa⁽²⁶⁾.

La capacidad infectiva obtenida para el tiempo 0 a 10 parásitos/célula, fue de 3 para *Leishmania (V.) braziliensis* y para *Leishmania (V.) peruviana* correspondió a 4,1, con un porcentaje de macrófagos

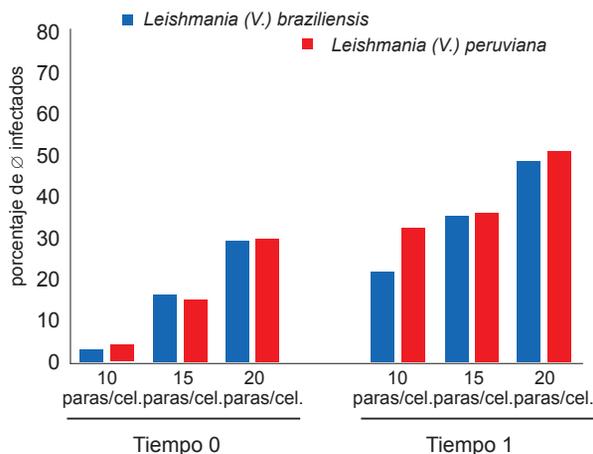


Figura 2. Porcentaje de macrófagos (Ø) infectados con *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana* a diferentes proporciones de parásitos/célula incubadas a 37 °C con 5% de CO²

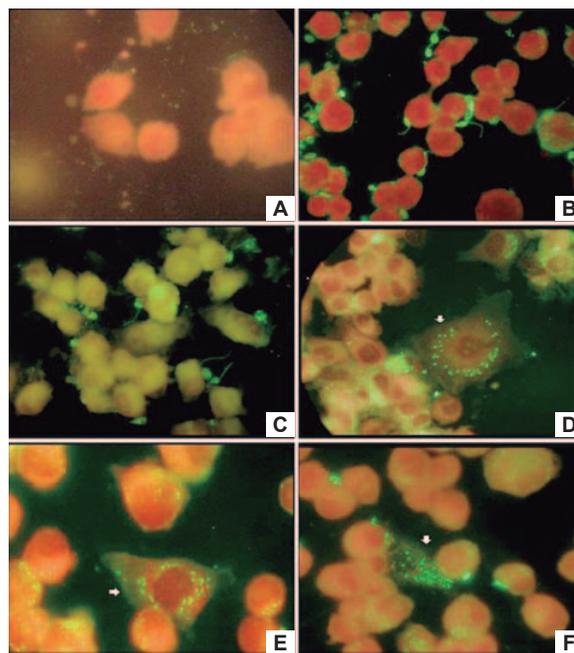


Figura 3. Macrófagos de *Canis familiaris* ATCC DH82 infectados con *Leishmania*, visualizado por inmunofluorescencia directa, 100x. El grupo control se muestra en **A)** macrófagos no infectados; los grupos infección se presentan en **B)** T₀ de la infección con *Leishmania (V.) peruviana*, a 15 parásitos/célula; **C)** T₀ de la infección con *Leishmania (V.) braziliensis*, a 15 parásitos/célula; **D, E, F)** T₁ de la infección con *Leishmania (V.) peruviana* a 20 parásitos/célula

infectados de 3 y 4% respectivamente, y un amastigote por célula en promedio; mientras que, la capacidad infectiva inicial a 15 y 20 parásitos/célula, en *Leishmania (V.) braziliensis* alcanzó valores de 26,72 y 66,70, con un porcentaje de macrófagos infectados de 16 y 29% y un promedio de 1 a 2 amastigotes por macrófago respectivamente; para *Leishmania (V.) peruviana* a las mismas proporciones, la capacidad infectiva inicial fue de 57,08 y 141,31 con 14,8 y 29,8% de macrófagos infectados, con un promedio de 3 y 4 amastigotes por macrófago respectivamente.

La capacidad infectiva de *Leishmania (V.) braziliensis* a las 48 h posinfección (tiempo 1), a 10 parásitos/célula se incrementó 34 veces y el porcentaje de macrófagos infectados fue de 22%, siete veces mayor en relación al tiempo 0 con un promedio de cuatro amastigotes por macrófago; mientras que, a 15 parásitos/célula, el incremento de la capacidad infectiva fue de 4,2 veces y de 2,2 veces para el porcentaje de macrófagos infectados con respecto al tiempo 0, con un promedio de tres amastigotes por macrófago; a 20 parásitos/célula la infectividad se incrementó 4,9 veces, con un 49% de macrófagos infectados, es decir 1,7 veces en comparación a la capacidad infectiva inicial (tiempo 0), además, presentó un promedio de seis amastigotes por macrófago, similares resultados fueron obtenidos para *Leishmania (V.) peruviana* (Tabla 1); en ambas especies, la mayor capacidad infectiva o infectividad observada fue a 20 parásitos/célula, al igual que el mayor porcentaje de macrófagos infectados y número de amastigotes por macrófago; sin embargo, el incremento de la capacidad infectiva en relación al tiempo 0 fue mayor a la proporción de diez parásitos/célula para ambas especies.

Estudios sobre infectividad *in vitro* de *Leishmania (V.) braziliensis* realizado por Kweider et al. (27), en macrófagos peritoneales de ratones inoculados con promastigotes obtenidos en medio GLSH (glucosa, lactoalbúmina, suero y hemoglobina), a la proporción de diez parásitos/célula, reportaron que el mayor porcentaje de macrófagos infectados así como el mayor promedio de amastigotes por macrófagos a las 48 h, se obtuvieron con promastigotes en fase estacionaria, en comparación a la fase logarítmica y la fase de declive o muerte, coincidiendo con nuestros resultados; el porcentaje de macrófagos infectados varió entre el 80-90% con un promedio de cinco a seis amastigotes por macrófago a las 24 h y entre 90-100% con promedio de seis a siete amastigotes por macrófago a las 48 horas (27), a diferencia del presente estudio donde los valores encontrados fueron menores.

Del análisis realizado en el presente estudio, se determinó que no existe diferencia significativa entre las especies a un nivel de confianza de 0,95; en el tiempo 0, para 10, 15, y 20 parásitos/célula, se encontró diferencia significativa entre las tres proporciones; mientras que, al tiempo 1, la diferencia significativa estuvo entre 10 y 20 parásitos/célula (datos no mostrados); nuestros resultados difieren de lo obtenido *in vitro* por Gamboa et al (28), quienes empleando macrófagos de murinos RAW 264, inoculados con 30 parásitos/célula de formas metacíclicas obtenidas a pH 5,5, en gradiente de ficoll a 30 parásitos/célula, quienes encontraron que el porcentaje de macrófagos infectados y el número de amastigotes/célula fue mayor para *Leishmania (V.) braziliensis* especialmente la cepa de origen mucocutánea (MHOM/PE/91/LC2043) seguido por la cepa de origen cutáneo (MHOM/PE/91/LC2177); las especies de *Leishmania (V.) peruviana* mostraron una menor infectividad principalmente la cepa procedente de la sierra sur del Perú (MHOM/PE/90/LCA08) en comparación a la cepa procedente de la sierra norte (MHOM/PE/90/HB86) (28).

La diferencia con los resultados del presente estudio, podría estar relacionada con la interacción de factores como la forma parasitaria empleada (formas metacíclicas puras), la población parasitaria (homogénea o heterogénea), la línea celular empleada, donde la susceptibilidad está ligada a su naturaleza, siendo los cultivos primarios los que presentan mayor susceptibilidad, no obstante, presentan tiempo limitado de crecimiento y bajo rendimiento (29), además, las diferentes líneas celulares secundarias presentan receptores para los diversos factores de virulencia de la especie de *Leishmania* (28); otros factores serían el número de pasajes (18,30), y el pH del medio de cultivo empleado en la obtención de las formas virulentas o metacíclicas (22,28,30).

Basados en estos resultados, se recomienda evaluar la capacidad infectiva de los promastigotes metacíclicos de cepas de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* en líneas celulares, empleando parásitos recientemente aislados y promastigotes metacíclicos obtenidos *in vitro*; a fin de determinar el modelo de infección *in vitro* más adecuado, que permita efectuar estudios de susceptibilidad a las drogas leishmanicidas existentes y a otras alternativas terapéuticas, para el control de la enfermedad.

Contribuciones de autoría: KD y NM han participado en la concepción del artículo, la recolección de datos, su redacción del artículo y además NM brindó asesoría técnica, ACS y ACT participaron en el aporte de material de estudio, COC participó con la asesoría estadística y GSMG

participó en la revisión crítica del artículo y aprobación de su versión final.

Fuentes de financiamiento: el presente trabajo conto con el apoyo de insumos y materiales, además del uso de los equipos

del Laboratorio de Leishmaniasis del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, Perú.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación del artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sanchez-Saldaña L, Saenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, Regis-Roggero A. *Leishmaniasis*. Dermatología Peruana. 2004;14(2):82-98.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Red Nacional de Epidemiología (RENACE), Dirección General de Epidemiología. Sala situacional de salud Perú. Semana Epidemiológica 53 - 2014. Lima: MINSA; 2014.
- Chang K, Reed SG, Megwire BS, Soong L. *Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity*. Acta Trop. 2003 Mar;85(3):375-90.
- Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J. *Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient?*. Trends Parasitol. 2004 Jul;20(7):297-301.
- Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. *Molecular determinants of Leishmania virulence*. Annu Rev Microbiol. 1990;44:499-529.
- Handman E, Bullen DV. *Interaction of Leishmania with the host macrophage*. Trends Parasitol. 2002 Aug;18(8):332-4.
- Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania-Induced Inactivation of the Macrophage Transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63*. PLoS Pathog. 2010 Oct 14;6(10):e1001148. doi: 10.1371/journal.ppat.1001148.
- Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK. *Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology*. J Invertebr Pathol. 2005 Jan;88(1):1-7.
- Thomas SR, Elkinton JS. *Pathogenicity and virulence*. J Invertebr Pathol. 2004 Mar;85(3):146-51.
- Casadevall A, Pirofski L. *Host-pathogen interactions: the attributes of virulence*. J Infect Dis. 2001 Aug 1;184(3):337-44.
- Casadevall A, Pirofski LA. *Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity*. Infect Immun. 1999 Aug;67(8):3703-13.
- Muskus CE, Villa MM. *Metaciclógenesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania*. Biomédica. 2002;22(2):167-77.
- Handman E. *Cell biology of Leishmania*. Adv Parasitol. 1999;44:1-39.
- Sereno D, Cordeiro-da-Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. *Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures*. Parasitol Int. 2007 Mar;56(1):3-7.
- Stinson S, Sommer JR, Blum JJ. *Morphology of Leishmania braziliensis: changes during reversible heat-induced transformation from promastigote an ellipsoidal form*. J Parasitol. 1989 Jun;75(3):431-40.
- Almeida MC, Cuba CA, de Sa CM, Pharoah MM, Howard KM, Miles MA. *Metaciclógenesis of Leishmania (Viannia) braziliensis in vitro: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993 May-Jun;87(3):325-9.
- Da Silva R, Sacks DL. *Metaciclógenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation*. Infect Immun. 1987 Nov;55(11):2802-6.
- Soares RPP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MS, Pimenta PFPP, Turco SJ. *Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis*. Int J Parasitol. 2005 Mar;35(3):245-53.
- De Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. *Glycoconjugates in New World species of Leishmania: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts*. Biochim Biophys Acta. 2012 Sep;1820(9):1354-65. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.11.001.
- Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PA, Marques-da-Silva EA, Gonçalves R, de Moura SA, et al. *Leishmania metacyclogenesis is promoted in the absence of purines*. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(9):e1833. doi: 10.1371/journal.pntd.0001833.
- Zakai HA, Chance ML, Bates PA. *In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana*. Parasitology. 1998 Apr;116(Pt4):305-9.
- Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, et al. *Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages*. Parasit Vectors. 2013 Mar 7;6:54. doi: 10.1186/1756-3305-6-54.
- Nieves E, Rondón M. *Metaciclógenesis y desarrollo de Leishmania (Leishmania) amazonensis (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Lutzomyia ovallesi (Diptera: Psychodidae)*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2010;30:121-7.
- Monzote Hidalgo L, Montalvo Alvarez AM, Fonseca Géigel L, Pérez Pineiro R, Suarez Navarro M, Rodriguez Cabrera H. *Efecto de derivados de la tiadiazina sobre la capacidad infectiva de promastigotes de Leishmania amazonensis*. Rev Cuba Med Trop. 2006;58(1):25-9.
- Gamboa Marín YA, Delgado Murcia LG. *Estudio de la infección de*

- Leishmanias* del complejo *Viannia* mediante citometría de flujo y coloración de Giemsa empleando líneas de macrófagos humanos y murinos (U-937 y J-774). *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2008;37(1):84-95.
27. Kweider M, Lemesre JL, Darcy F, Kusnierz JP, Capron A, Santoro F. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J Immunol.* 1987 Jan;138(1):299-305.
28. Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arévalo J, Dujardin JC. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology.* 2008 Mar;135(3):319-26.
29. Meza C, Muñoz DL, Echeverry MCM, Vélez ID, Robledo SM, Mesa CV, et al. Susceptibilidad in vitro a infección por difiere según tipo de macrófagos. *Salud UIS.* 2010;42(61):200-11.
30. López López MC. *Parasitología molecular.* Madrid: CSIC-CSIC; 1993.

Correspondencia: Gloria Minaya-Gómez
Dirección: Capac Yupanqui 1400 Jesús María. Lima, Perú
Teléfono: (01)748 1111 anexo 2167
Correo electrónico: gminaya22@gmail.com

PERÚ Ministerio de Salud Instituto Nacional de Salud

Recetario nutritivo para niñas y niños

De 6 a 23 meses

Investigar para proteger la salud