

January 2005

Evaluación del proceso infectivo de *Leishmania chagasi* en la línea celular lulo, con base en variables ambientales y fisicoquímicas

Alfonso Arturo Miranda Henriquez
almirh79@yahoo.com

William Fabián Serrano Sarmiento
wfss_serrano74@yahoo.com

Martha Ayala Sotelo
Instituto Nacional de Salud, revistamedicinaveterinaria@lasalle.edu.co

Felio Bello Garcia
Universidad de La Salle, fbello@urosario.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Miranda Henriquez AA, Serrano Sarmiento WF, Ayala Sotelo M y Bello Garcia F. Evaluación del proceso infectivo de *Leishmania chagasi* en la línea celular lulo, con base en variables ambientales y fisicoquímicas. *Rev Med Vet.* 2005;(10): 23-38.

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Evaluación del proceso infectivo de *Leishmania chagasi* en la línea celular Lulo, con base en variables ambientales y fisicoquímicas

Alfonso Arturo Miranda Henriquez* / William Fabián Serrano Sarmiento**
Martha Ayala Sotelo*** / Felio Bello Garcia****

RESUMEN

El presente estudio describe la evaluación de la infección *in vitro* de *Leishmania chagasi* en una línea celular Lulo, derivada de tejidos embrionarios de *Lutzomyia longipalpis*, teniendo en cuenta variables ambientales y fisicoquímicas. El medio Grace/L-15, suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB), fue utilizado para el mantenimiento de la línea celular Lulo. La cepa CL044B/84 de *Leishmania chagasi* se empleó en la infección de las células. Las variables fisicoquímicas del medio de cultivo tenidas en cuenta para los ensayos experimentales de la infección celular fueron: concentración de SFB (5%, 10%, 15% y 20%), ausencia y presencia de hemolinfa, pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5 y 6.8) y osmolalidad (350 mOsm/kg, 400 mOsm/kg y 450 mOsm/kg); también se evaluó la

temperatura a la cual fueron incubadas las células infectadas (28°C, 32°C y 37°C). Cajas de cultivos estériles de 24 pozos, conteniendo laminillas de 12 mm de diámetro al interior de cada uno de ellos, se usaron como sustrato de las células infectadas; éstas se retiraron a los 3, 6 y 9 días postinfección. El mayor porcentaje de infección (33,3%) se alcanzó al 5% de SFB, a pH de 6,8, osmolalidad de 320 mOsm/Kg y a una temperatura de incubación de 26°C, sin atmósfera de CO₂. La selección de estas óptimas condiciones fisicoquímicas y ambientales en el proceso infectivo del parásito al interactuar con las células Lulo, permitió alcanzar niveles relativamente altos de infección, los cuales serán útiles en estudios básicos y aplicados, en la perspectiva de contribuir al control de la *leishmaniasis*.

Palabras clave: *Leishmania chagasi*, *Lutzomyia longipalpis*, variables fisicoquímicas, porcentajes de infección, condiciones ambientales.

* Médico veterinario, Universidad de La Salle. Correo electrónico: almirh79@yahoo.com

** Médico veterinario, Universidad de La Salle. Correo electrónico: wfss_serrano74@yahoo.com

*** Bacterióloga, Candidata MSc. Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud.

**** MSc, Candidato a PhD. Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética, Universidad de La Salle. Correo electrónico: fbello@urosario.edu.co

Fecha de recepción: 16 de marzo de 2005.

Fecha de aprobación: 1 de septiembre de 2005.

⇒B: 97HJ 9 DFC79GG 9J 5@ 5HCB 6M
@9-G<A 5B=5 f@L 7<5; 5G= ⇒B H 9 @ C 79@@
@-B9Ž: C7I G-B; CB D<MG=7C7<9A =75@ 5B8
9BJ =FCBA 9BH5@ J 5F =56@9G

56GF57H

The following research describes the evaluation in the *in vitro* infection by *Leishmania (L.) chagasi* in a Lulo cell line, resulting from *Lutzomyia longipalpis* embryonic tissue, taking into account physicochemical and environmental variables. The medium Gracel/L-15, containing 5% Fetal Bovine Serum (FBS), was used to maintain the cell strain Lulo. The infection process was performed by using *Leishmania chagasi* CLO44B/84 strain. The physicochemical variables of the growing medium evaluated for the experimental tests of the cell infection were: concentration of FBS (5%, 10%, 15%, and 20%), presence and absence of hemolinf, pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, and 6.8) and osmolality (350, 400 y 450 mOsm/kg). In addition, the temperature which the infected cells were incubated (26 °C, 32 °C and 37 °C) was also evaluated. As substrate for

the infected cells, glass cover-slips of 12 mm of diameter in 24 well plates were used. The cover-slips with attached infected cells were removed after 3, 6, and 9 days post-infection. The Experimental observations showed that the greatest percentage of infection (33.3%), was obtained at the 5% FBS level, osmolality of 320 mOsm/Kg, a pH of 6.8 and an optimum temperature of 26 °C. By selecting these parameters, high levels of infection were reached and these results will certainly be of great use in future studies and applications of the interaction vector-parasite-cells, in the perspective to contribute with leishmaniasis control.

Key words: *Leishmania chagasi*, *Lutzomyia longipalpis*, physicochemical variables, infection percentage, environmental variables.

RESUMEN

Los parásitos del género *Leishmania* presentan dos formas básicas en su ciclo biológico, los amastigotes y los promastigotes. Los amastigotes viven dentro de las vacuolas lisosomales presentes en las células macrofágicas del huésped vertebrado, los cuales son ingeridos por la hembra del flebótomo cuando ésta se alimenta de sangre infectada (Lainson *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1990; Alexander *et al.*, 1999). Una vez en el intestino medio el parásito se transforma en promastigote. Esta forma extracelular puede encontrarse libre o anclada en la cutícula o en las microvellosidades del intestino (Walters *et al.*, 1989; Killick-Kendrick, 1990).

El ciclo de vida de las especies de *Leishmania* se ha venido estudiando, experimentalmente, *in vivo* e *in vitro*, en el primer caso, en flebótomos y roedores (Killick-Kendrick, 1986; Molyneux and Killick-kendrick, 1986; Bates, 1997), en tanto que *in vitro* se utilizan, principalmente, cultivos celulares de vertebrados (Mattock and Petters, 1975; Chang and Dwyer, 1976; Chang, 1978; Chang, 1979; Pearson *et al.*, 1981; Aikawa *et al.*, 1982; Dedet *et al.*, 1983; Schwartzmanj and Pearson, 1985; Corte-Real *et al.*, 1995; Hérvas-Rodríguez *et al.*, 1996; Pessotti *et al.*, 2004) y, también, medios de cultivos libres de células, donde los parásitos se someten a pH ácidos y altas temperaturas, como condición para obtener la transformación de los promastigotes a amastigotes (Bates and Tetley, 1993; León and Soares, 1995). Sin embargo, no existe información del desarrollo del ciclo biológico del género *Leishmania* en flebótomos vectores, a excepción de trabajos recientemente efectuados en este grupo de investigación (Zapata, 2004; Acero y Galeano, 2005). No obstante, por primera vez en el presente trabajo, se estudia el proceso infectivo de *L. chagasi* en la línea celular Lulo teniendo en cuenta variables ambientales y fisicoquímicas del medio de cultivo.

La obtención de las líneas celulares de insectos vectores, derivadas de células embrionarias, larvas neonatas y de tejidos de adultos, ha permitido el mantenimiento y reproducción de agentes patógenos (Leake, 1997; Fampa *et al.*, 2003), diferentes a parásitos del género *Leishmania*, en la perspectiva de facilitar el estudio estructural y bioquímico, básico en la posterior elaboración de biológicos que sirven para prevenir y controlar enfermedades, así como en el desarrollo de técnicas diagnósticas utilizadas en la detección de antígenos, por lo cual tienen importancia en salud pública y justifican la necesidad de continuar desarrollando este tipo de investigaciones. La implementación de cultivos celulares derivados de flebótomos vectores para el desarrollo del ciclo de vida de *L. chagasi*, tal como ocurrió en el presente trabajo, constituye una alternativa válida para develar eventos desconocidos o pobremente conocidos en la interacción del parásito con las células hospederas.

Este trabajo se realizó con el propósito de obtener nuevos conocimientos del proceso de infección de los parásitos en condiciones *in vitro*, utilizando variables ambientales y fisicoquímicas del medio de cultivo, en los sustratos celulares derivados del insecto vector (*Lutzomyia longipalpis*).

ABSTRACT

INTRODUCTION

Se utilizó la línea celular Lulo (Rey *et al.*, 2000) derivada de explantes de tejido embrionario, de huevos y larvas de *Lu. longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912), caracterizada por presentar células con morfología epitelioides y fibroblastoide, las cuales se mantuvieron en el medio L-15/Grace, suplementado con SFB inactivado al 5%, con una osmolalidad de 300 a 320 mOsm/Kg, pH de 6,8 e incubada a una temperatura de 26° C. Los pases

se realizaron en frascos estériles mediante la remoción mecánica de células; previa observación de una monocapa confluyente del cultivo. Para la utilización de la línea celular en las pruebas de infección, se seleccionaron aquellos cultivos que presentaron una monocapa semiconfluyente.

; FI DC 7CBHFC@

La línea celular J774 (Ralph y Nakoinz, 1975) derivada de ratón Balb/c hembra, con propiedad fagocítica, se mantuvo en el medio RPMI, suplementado con SFB inactivado al 5% y se incubó a una temperatura de 37°C. Esta línea celular se empleó como control de las infecciones. Tal como se hizo con las células Lulo, se realizaron pases en frascos estériles mediante remoción mecánica; previa observación de una monocapa confluyente del cultivo. Finalmente, para la utilización de la línea celular en la infección, se seleccionaron aquellos cultivos que presentaron monocapas semiconfluentes.

D5FI G-HCG

Se empleó la cepa MH/CO/84/CL-044 de *L. chagasi* suministrada por el laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud de Colombia, los parásitos se mantuvieron en el medio NNN bifásico modificado con Schneider's, enriquecido con SFB inactivado al 10% e incubados a una temperatura de 26°C. La inoculación de los parásitos a las células se efectuó cuando estos estuvieron en estado metacíclico.

J 5F =56@9G

Las variables que se tuvieron en cuenta en el proceso de infección, fueron las siguientes: concentración de SFB (5, 10, 15 y 20%), hemolinfa (presencia y ausencia en el medio de cultivo), pH

(5.0, 5.5, 6.0, 6.5 y 6.8), osmolalidad (350, 400 y 450 mOsm/kg) y temperatura (26° C, 32° C y 37° C). Cada uno de los medios de cultivo se mantuvo en forma independiente, refrigerados a 5° C, hasta que se utilizaron en el proceso infectivo.

=B: 977-ÖB`79@ @5F

Los procedimientos de manipulación de los parásitos y las células, se realizaron en una cabina de flujo laminar vertical, bajo las medidas de seguridad y manejo biológico del protocolo empleado en el Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Salle.

Para realizar la infección se tuvieron en cuenta que los parásitos de *L. chagasi* se encontraran en su estado metacíclico, también, que las células Lulo y la línea celular J774 estuvieran en un óptimo estado de crecimiento. Cuando los cultivos celulares formaron una monocapa confluyente en sus respectivos frascos, se procedió a efectuar la remoción mecánica, para luego proceder a centrifugarlas a una velocidad de 1500 r.p.m durante 10 minutos, luego el precipitado se resuspendió en medio de cultivo fresco; las células se sembraron a una concentración promedio de 2×10^3 células/ml (Fampa *et al.*, 2003), en cajas que contenían 24 pozos, cada uno de ellos con una laminilla estéril de 12 mm en la parte inferior. Se dejaron en incubación por un tiempo de 24 horas hasta lograr una monocapa semiconfluyente de células adheridas a las laminillas.

Las variables se manejaron en forma independiente; para el pH se utilizaron 3 filas con 5 columnas de la caja, en las que se les adicionó el medio con los pH de 5.0 a 6.8. La última fila se empleó para presencia y ausencia de hemolinfa. Los 3 pozos restantes de la última columna fueron usados para las osmolalidades de 350, 400 y 450 mOsm/Kg.

El medio Grace/L15, contenido en frascos rotulados con las diferentes concentraciones de SFB, se distribuyó en la caja de 24 pozos de la siguiente forma: se tomó la primera fila para la concentración al 5% y las filas siguientes se utilizaron para las infecciones, con las concentraciones de 10%, 15% y 20% de SFB.

Después de 24 horas de siembra de las células, se procedió a escoger los frascos de parásitos que mostraron mejor capacidad infectiva (metacíclicos), se depositaron en tubos estériles y fueron centrifugados a 2500 r.p.m durante 10 minutos.

El precipitado se resuspendió y homogenizó con el medio de cultivo preparado anteriormente para cada experimento. La adición de los parásitos a cada pozo se hizo en una concentración promedio de 1×10^6 parásitos/ml, (relación de 10:1), posteriormente, estas cajas de cultivo fueron selladas y llevadas a incubación a las temperaturas programadas (26° C, 32° C y 37° C), con la excepción de la variable SFB (5%, 10%, 15% y 20%), que sólo se incubó a 26° C. A las 12 horas se realizó un lavado con solución salina fisiológica al 0,9% para evitar el exceso de parásitos en el medio y a cada pozo se le adicionó medio fresco.

Las laminillas se retiraron de los pozos los días 3, 6 y 9 postinfección, con la excepción de las laminillas empleadas con la variable osmolalidad que todas se tomaron el día 6, en el resto de pozos se retiró el medio de cultivo metabolizado y se adicionó medio fresco. Las laminillas que se fueron retirando en los días señalados, se lavaron con solución salina fisiológica, se dejaron secar al medio ambiente y posterior a la fijación de éstas con metanol puro, se procedió a colorearlas con Giemsa; finalmente, se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de colorante. La observación al microscopio en aumento de 1000X, se realizó después del montaje

de las laminillas en láminas portaobjetos, selladas con Entellán.

Los experimentos realizados con las variables seleccionadas se repitieron cuatro veces, para lograr la reproducibilidad de los datos y un análisis de la información más homogénea.

5BI @-G`89`@5`-B: CFA 57-ÖB

La lectura de las láminas se realizó con la ayuda de un microscopio de luz, escogiendo campos en forma aleatoria, registrando los datos de células por campo y células infectadas. El porcentaje de infección se obtuvo de la multiplicación del número de células infectadas por 100 y dividido por el número de células por campo.

Los datos obtenidos fueron analizados en el Software SPSS para Windows versión 8.0, en el cual se aplicó el análisis descriptivo, el análisis factorial AxB para SFB y osmolalidad, el análisis factorial AxBxC para hemolinfa y pH, además, el test de Tukey de comparación múltiple de promedios. Los resultados de la probabilidad (P) arrojados por el Software, fueron analizados para determinar si hubo o no diferencias entre los grupos de la siguiente manera: $P > 0,05$ no hubo diferencias significativas; $P < 0,05$ hubo diferencias significativas y $P < 0,01$ hubo diferencias altamente significativas.

F 9G @-H8CG

En la Tabla 1 se puede observar que el valor más alto de infección se registró en concentraciones de SFB al 5% con un promedio de 33,3%, disminuyendo a medida que se incrementó la concentración de esta sustancia en el medio de cultivo, siendo el 20% de SFB la concentración con menor promedio de infección con 15,1%. Las células presentaron una diferencia altamente significativa en el porcentaje

H6e5 "% 85HCG DFCA 98=C 89 @5 =B: 977=ÖB 89 @7 <5; 5G= 9B @CG 71 @HJ CG 79@ @5F 9G @ @CŽ 7CB 65G9 9B @5G J 5F=56@9G) I Ž % \$ I Ž % @ I i m & \$ I 89 G 6 9B @CG 8 9G Ž * i - DCQH B: 977=ÖB "

SFB (%)	DÍAS POST- INFECCIÓN	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	N
5	3	0,2957	0,0606	4
	6	0,3685	0,0631	4
	9	0,3355	0,0764	4
Total		0,3332	0,0681	12
10	3	0,2625	0,0522	4
	6	0,3205	0,0551	4
	9	0,2893	0,0691	4
Total		0,2908	0,0590	12
15	3	0,2435	0,0448	4
	6	0,2640	0,0352	4
	9	0,2460	0,0422	4
Total		0,2512	0,0382	12
20	3	0,1543	0,0398	4
	6	0,1585	0,0340	4
	9	0,1430	0,0391	4
Total		0,1519	0,0348	12
Total	3	0,2390	0,0702	16
	6	0,2779	0,0917	16
	9	0,2534	0,0905	16
Total		0,2568	0,0844	48

de infección alcanzado al 5% de SFB, con respecto a las concentraciones del 15 y 20% ($P < 0.000$, 3 gl, $n=4$), también fueron altamente significativas las diferencias de porcentajes de infección entre las concentraciones del 10 y el 20% ($P < 0.000$, 3 gl, $n=4$), según la prueba ANOVA y el test de Tukey.

En la Tabla 2, se observa un aumento del porcentaje de infección (8,6%), obtenido en presencia de la variable hemolinfa al 5% con relación al 0% (5,7%) en el total general, apreciándose diferencias altamente significativas entre los dos tratamientos ($P < 0.000$, 1 gl, $n=2$), según la prueba de ANOVA. Si se observan, detenidamente, los resultados de las

dos concentraciones de hemolinfa a temperaturas de 26° C, 32° C y 37° C, son notorias las diferencias altamente significativas entre ellas ($P < 0.000$, 2 gl, $n=3$). Al comparar los resultados de la variable hemolinfa al 0% individualmente, se registraron diferencias altamente significativas cuando se incubaron a las temperaturas de 26°C (7%) y 37°C (4,3%) ($P < 0.000$, 2 gl, $n=3$) y, finalmente, en los ensayos de infección con la variable hemolinfa al 5%, hubo diferencias altamente significativas entre los resultados obtenidos en presencia de las 3 temperaturas de incubación seleccionadas ($P < 0.000$, 2 gl, $n=3$), según la prueba de ANOVA y el test de Tukey.

HEMOL	TEMP (°C)	DIAS POSTINFECCIÓN	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	N	
0%	26	3	0,0625	0,0173	4	
		6	0,0870	0,0147	4	
		9	0,0608	0,0231	4	
		Total		0,0701	0,0210	12
	32	3	0,0568	0,0139	4	
		6	0,0591	0,0108	4	
		9	0,0563	0,0204	4	
		Total		0,0574	0,0141	12
	37	3	0,0406	0,0061	4	
		6	0,0475	0,0113	4	
		9	0,0418	0,0060	4	
		Total		0,0433	0,0080	12
	Total	3	0,0533	0,0154	12	
		6	0,0645	0,0206	12	
		9	0,0529	0,0185	12	
	Total		0,0569	0,0186	36	
5%	26	3	0,1268	0,0133	4	
		6	0,1289	0,0210	4	
		9	0,1267	0,0117	4	
		Total		0,1275	0,0144	12
	32	3	0,0838	0,0185	4	
		6	0,0891	0,0186	4	
		9	0,0872	0,0185	4	
		Total		0,0867	0,0169	12
	37	3	0,0469	0,0075	4	
		6	0,0488	0,0066	4	
		9	0,0409	0,0125	4	
		Total		0,0455	0,0091	12
	Total	3	0,0858	0,0363	12	
		6	0,0889	0,0373	12	
		9	0,0849	0,0389	12	
	Total		0,0865	0,0364	36	

La variable osmolalidad (Tabla 3) muestra que la más alta infección ocurrió en las células sometidas a 350 mOsm/Kg, con un 12% promedio de infectividad e incubados a las temperaturas de 26° C, 32° C y 37° C; esta diferencia no fue significativa comparada

con los porcentajes de infección establecidos en presencia de osmolalidades a 400 y 450 mOsm/Kg, analizados en cada una de las temperaturas, según la prueba de ANOVA y el test de Tukey (P>0,05, 2 gl, n=3).

Tabla 4. Valores de Osmolaridad (mOsm/Kg) en diferentes temperaturas (26, 32 y 37 °C) y pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5 y 6,8) en el promedio total de las infecciones en los diferentes pH.

TEMP (° C)	VARIABLE OSM (mOsm/Kg)		
	350	400	450
26	0,149(±,04,55)	0,133(±,0452)	0,138(±,0344)
32	0,130(±,01,99)	0,118(±,02,91)	0,117(±,0297)
37	0,092(±,04,12)	0,087(±,0397)	0,085(±,0369)
Promedio total	0,124(±,04,18)	0,113(±,0402)	0,111(±,0366)

En la Tabla 4 se observa como aumentaron y disminuyeron, sin ningún orden, los valores promedio de las infecciones en los diferentes pH. El resultado más alto se presentó a pH de 6,8 con 22,4% de infección en el promedio total, observándose una diferencia altamente significativa

entre este y los otros tratamientos (5,0, 5,5, 6,0 y 6,5) (P<0,000, 4 gl, n=5), también se encontraron diferencias significativas entre los valores de pH 5,0 y 5,5 (P=0,034, 4 gl, n=5), según la prueba de ANOVA y el test de Tukey.

Tabla 5. Valores de Osmolaridad (mOsm/Kg) en diferentes temperaturas (26, 32 y 37 °C) y pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5 y 6,8) en el promedio total de las infecciones en los diferentes pH.

pH	TEMP (° C)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	N
5,0	26	0,1805	0,1361	12
	32	0,1913	0,1677	12
	37	0,0945	0,0361	12
	Total	0,1555	0,1304	36
5,5	26	0,1393	0,1363	12
	32	0,1051	0,0703	12
	37	0,0851	0,0689	12
	Total	0,1099	0,0969	36
6,0	26	0,1608	0,0499	12
	32	0,1478	0,0595	12
	37	0,1099	0,0327	12
	Total	0,1395	0,0521	36
6,5	26	0,1539	0,0577	12
	32	0,1058	0,0602	12
	37	0,0881	0,0267	12
	Total	0,1160	0,0566	36
6,8	26	0,3333	0,0682	12
	32	0,2113	0,0470	12
	37	0,1287	0,03,97	12
	Total	0,2244	0,0996	36

En general, los porcentajes de infección más altos se obtuvieron el día 6 postinfección, en los medios de cultivos que tuvieron concentración de SFB al 5%, con pH a 6.8, osmolalidad de 320 mOsm/Kg e incubados a 26° C. En la Figura 1 se muestra una célula Lulo, infectada bajo las anteriores condiciones.

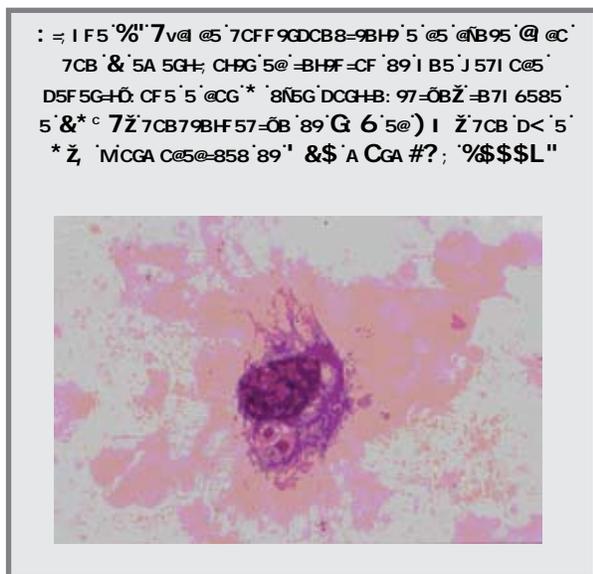


Fig. 1. Célula Lulo infectada con *Leishmania chagasi*.

Fig. 1. Célula Lulo infectada con *Leishmania chagasi*.

Las células Lulo, en sus inicios, registraron una mejor adaptación y proliferación en concentraciones de SFB altas (20%) (Bello *et al.*, 1996), así como se obtuvo en otros cultivos celulares primarios, por ejemplo, en *L. shannoni* (Jiménez *et al.*, 1997) y en *Psorophora confinnis* (Bello *et al.*, 2001). No obstante, durante el desarrollo y evolución de los subcultivos de la presente línea celular, la concentración de SFB fue disminuyendo, a medida que las células se adaptaron mejor al medio de cultivo hasta alcanzar la concentración del 5% (Rey *et al.*, 2000). La línea celular Lulo, utilizada para la infección con *L. chagasi*, fue evaluada en presencia del medio L-15/Grace, suplementado con

SFB en diferentes concentraciones (5%, 10%, 15%, 20%), observando que en todas ellas hubo adecuado crecimiento y proliferación celular, sin embargo, se pudo establecer durante el mantenimiento previo a la infección con el parásito, que a concentraciones de SFB altas los índices mitóticos y los procesos adaptativos de las células se incrementaron, tal como ocurrió al 10, 15 y 20%. De forma similar, este comportamiento de las células ha sido registrado en otros cultivos celulares de insectos, por ejemplo, Watanabe (1987), al observar el crecimiento celular en cultivos de células *Bombix mori* (BM-N), obtuvo una mayor proliferación y densidad celular a las concentraciones de SFB del 10 y 20%, después de 10 días de siembras, mientras que al 5% de SFB se aproximaron a la misma densidad poblacional de células, pero a los 17 días postsiembra. No obstante, obtuvo el óptimo crecimiento y densidad celular al 10% de SFB en los iniciales 10 días de siembra; en este mismo tiempo, también hubo un ligero descenso a la concentración de SFB al 20% y una fuerte disminución al 5%.

Los resultados, en porcentaje de infección con *L. chagasi* en las células Lulo, fueron mayores al 5% de SFB (33,3%), disminuyendo a medida que se incrementó la concentración de esta sustancia. Lo anterior indica que, probablemente el parásito al disponer de altas concentraciones de sustancias nutritivas adicionales en el medio de cultivo, le facilitaron una permanencia prolongada en el estado promastigote y en cierta forma hubo inhibición de los procesos de transformación y diferenciación a la forma intracelular amastigota, por lo cual, la replicación extracelular fue mayor y la población del parásito se incrementó. Se puede inferir, también, que el SFB a altas concentraciones en el medio de cultivo que comparte el parásito con las células, origina una disminución de las interacciones que se establecen a nivel del parásito con las células, particularmente, las relaciones

ligando-receptor, trayendo consecuentemente, menores porcentajes de infección.

Es necesario, de todas formas, señalar que los parásitos de *Leishmania*, cuando se mantienen en medios axénicos, requieren para una mejor adaptación y proliferación óptimas concentraciones de SFB; por lo cual, los nutrientes que hacen parte de este suplemento no se pueden abruptamente suprimir del medio de cultivo, pues afectan la viabilidad y multiplicación de los parásitos, aun en condiciones de co-cultivos, como ocurrió en el presente trabajo.

<9A C@-B: 5

En el desarrollo de los primeros cultivos celulares de insecto, hacia la década de los 60, durante un periodo relativamente corto de tiempo, se utilizó hemolinfa de langosta como suplemento nutritivo (Chiu and Black, 1967; Oberlander, 1967; Yunker *et al.*, 1967), esta sustancia fue luego reemplazada por SFB.

En el presente trabajo, el porcentaje de infección con hemolinfa al 5% fue menor que con SFB a la misma concentración, este resultado se debe probablemente, a la presencia de ciertos péptidos con actividad antimicrobial en la hemolinfa de algunos dípteros, tal como lo reporta Boulanger (2004). Aunque la hemolinfa utilizada fue de *Limulus polyphemus*, se supone que esta también tiene los factores que alteraron la actividad del parásito.

Sin embargo, una característica notable fue que hubo un mayor promedio general de infección del parásito con la hemolinfa al 5% (8,6%) con relación a la ausencia de esta sustancia (5,7%), apreciándose una diferencia altamente significativa entre presencia y ausencia, según la prueba de ANOVA. Debido a que tal como sucede con el SFB,

la hemolinfa presenta ciertos elementos y factores que intervienen y ayudan al desarrollo celular, probablemente, también, estimulan la capacidad infectiva del parásito.

Se ha demostrado que la temperatura induce la transformación de promastigotes en amastigotes axénicos. Una vez disminuye ésta, el flagelo crece de nuevo y los parásitos reanudan su habilidad para infectar (Zilberstein y Shapira, 1994). Lo anterior puede explicar la forma como disminuyó la infección en las células Lulo, suplementadas o no con hemolinfa a medida que se aumentó la temperatura con una diferencia entre ellas altamente significativa en presencia de hemolinfa, según la prueba de ANOVA y el test de Tukey.

CGA C@5@-858

La presión osmótica de los medios de cultivos afectan el crecimiento y la sobrevivencia de los cultivos celulares de mamíferos e insectos (Sohi, 1980). La presión osmótica óptima en líneas celulares de mamífero es de 340 mOsm/Kg (Sohi, 1980) en contraste, algunos cultivos celulares de insectos proliferan mejor entre 360 a 375 mOsm/Kg (ATCC, 2003).

Los resultados obtenidos con esta variable muestran que la infección más alta ocurrió en los cultivos celulares sometidos a la osmolalidad de 350 mOsm/Kg, con un 12% promedio de infectividad e incubados a 26° C, 32° C y 37° C, esta diferencia no fue significativa comparada con las osmolalidades de 400 mOsm/Kg (11,4%) y 450 mOsm/Kg (11,3%), analizadas en cada una de las temperaturas, según la prueba de ANOVA y el test de Tukey. Al parecer, estas osmolalidades no alteraron en forma significativa la fisiología y morfología celular; lo anterior ha sido corroborado en diferentes trabajos, con células de insecto. Así por ejemplo, algunas líneas celulares de *Drosophila melanogaster* crecieron

mejor en un medio, sometido a una osmolalidad de 365 mOsm/Kg (Echalier y Ohanessian, 1969), otras líneas celulares de cucaracha se cultivaron eficientemente a una osmolalidad de 440 mOsm/Kg (Landureau y Jolles, 1969). En esta misma tendencia, cultivos celulares de *Heliothis zea* mostraron un máximo de crecimiento a 320 mOsm/Kg (Kurtti y Brooks, 1972), y células de *Agallia constricta* y *Aceratagallia sanguinolenta* tuvieron un óptimo crecimiento a osmolalidades entre 360-405 mOsm/Kg (Martínez-López y Black, 1977).

En experimentos realizados por Darling and Blum (1990), se reportaron cambios en la morfología de *L. major*, inducidos por modificaciones en la osmolalidad, alterados por el uso de glucosa. En los experimentos realizados, en las distintas osmolalidades, del presente trabajo, se obtuvieron porcentajes de infección más bajos, que los observados en los tratamientos con la variable SFB, debido a que posiblemente, la adición en exceso de NaCl que se utilizó para alcanzar las diferentes concentraciones de osmolalidad, pudo originar cambios fisiológicos o bioquímicos en el parásito, afectando su infectividad.

Al comparar los resultados obtenidos con la variable osmolalidad a diferentes temperaturas, se pudieron registrar diferencias significativas entre los promedios de infección a 26° C y 32° C (13,8% y 12,2% respectivamente), comparada con las infecciones hechas a 37° C (8,8%); en los 2 primeros no hubo diferencias significativas, según la prueba de ANOVA y el test de Tukey. Es decir, que al aumentar la temperatura, hubo disminución de los porcentajes de infección, lo cual se puede explicar por la poca adaptación que tuvieron las células Lulo a temperaturas altas, las cuales produjeron desprendimiento y muerte celular. Por lo tanto, los parásitos no tuvieron los

sustratos celulares suficientes para efectuar la internalización y consecuente transformación.

Al igual que en la variable anterior, se demostró que las células de insectos, en el presente caso, derivadas del flebótomo *L. longipalpis*, no se adaptaron ni resistieron altas temperaturas y, probablemente, tampoco niveles elevados de osmolalidad.

D<`MÍHA D9F5H F5

Cuando se observan los cultivos celulares Lulo al microscopio, se evidenció una disminución en su población a medida que se bajó el pH (5,0 - 5,5, 6,0 - 6,5), esto se debe, probablemente, a que las células en condiciones *in vitro* reflejan el comportamiento del organismo en su ambiente natural, al no poder tolerar drásticos cambios de pH y temperatura (Zilberstein y Shapira, 1994). Se pudo evidenciar un notable deterioro de los cultivos celulares que se mantuvieron bajo condiciones adversas, como temperatura alta y pH bajo. Además, se ha encontrado que el pH del intestino medio de los flebótomos es similar al encontrado en los mosquitos (>8,5) (Billingsley, 1990; Dow, 1992).

Se sabe que algunos cultivos celulares de insecto, son muy sensibles a cambios de pH en el medio de cultivo. Células de *Anopheles stephensi* sobrevivieron solo a un estrecho rango de pH (6,9-7,0) y células de *Culex quinquefasciatus* requirieron un pH de 6,5 - 6,9 (Hsu *et al.*, 1972). El resultado más alto de infección lo presentaron las células Lulo en un medio de cultivo a pH 6,8 originando un 22,4% en el promedio total de infección, con una diferencia altamente significativa entre este y los otros tratamientos (5,0 - 5,5 - 6,0 y 6,5), según la prueba de ANOVA y el test de Tukey, lo que puede significar que el pH a 6,8 en el medio de cultivo

es el más apto tanto para la sobrevivencia de las células Lulo, como para el desarrollo de la infección de los promastigotes. Por ejemplo, promastigotes de *L. mexicana* expresaron mejor en su superficie una metaloproteinasa (gp63), que exhibe una mejor actividad a pH similar a 7 (Ilg *et al.*, 1993), la cual permite una mejor adhesión del parásito a la célula.

Los valores del porcentaje de infectividad que se encontraron con pH bajos, son alterados por la disminuida población celular que se registra en el momento de adicionar los parásitos, por una poca adaptación y sobrevivencia de las células con pH bajos, siendo evidente esta situación cuando se hace la lectura de las láminas.

Los ensayos de las diversas temperatura en los medios de cultivo causaron un efecto similar e inverso a lo observado con el pH, transformando la morfología del parásito de formas promastigotas a amastigotas a medida que se enfrentaron a temperaturas elevadas, lo cual es explicado por Zilberstein y Shapira (1994), como una respuesta fisiológica de defensa del parásito observadas, tanto en cultivos de mamíferos, como en cultivos axénicos. En su estado natural, los parásitos son expuestos a diferentes condiciones de crecimiento entre vector y hospedero (temperatura, pH, nutrientes y componentes del suero) (Zilberstein y Shapira, 1994). En el vector, las diferentes especies de *Leishmania* enfrentan temperaturas de 22°C-28°C y durante la transmisión de estos al hospedero, son expuestos a altas temperaturas (31°C - 35°C en piel y arriba de 37°C en órganos viscerales).

Al observar los cultivos celulares infectados con la ayuda del microscopio invertido, notamos formas redondeadas del parásito a pH por debajo de 6,0, lo cual, probablemente, se puede explicar por la expresión de una proteína específica para los

estados amastigotes, expresada a un pH de 4,5 (pH similar al de los lisosomas de los macrófagos). Se afirma que los promastigotes asumen una forma como amastigote, al expresar altos niveles de esta proteína (Jaffe y Rachamim, 1989; Zilberstein y Shapira, 1994; Ilg *et al.*, 1993), también observaron, en sus estudios, que la forma amastigota de *L. mexicana*, expresó mejor la metaloproteinasa gp63 a pH de 5,5 - 6,0.

Al analizar los tiempos de la infección con esta variable, se presentó un alto promedio en los días 6 y 9, sin que presentaran diferencias significativas en el día 3 de la postinfección sin embargo, observamos que con pH 5,0, la infección del día 6 fue baja, comparada con los resultados de los otros pH, debido a la disminución de la población celular.

7CB7@ G=CB9G

Se evaluó el porcentaje de infección de *L. chagasi* en sustratos celulares derivados de *L. longipalpis*, teniendo en cuenta variables ambientales y fisicoquímicas del medio de cultivo como: suero fetal bovino, hemolinfa, osmolalidad, pH y temperatura.

Se comprobó la capacidad pluripotencial de las células Lulo para funcionar como células fagocíticas, al evidenciar en ellas la presencia de los amastigotes al interior de sus vacuolas parasitóforas.

Se demostró, que los promastigotes de *L. chagasi*, pudieron internalizarse en células derivadas de tejidos embrionarios del flebótomo vector, luego se transformaron en amastigotes y finalmente, se reprodujeron intracelularmente.

En el presente estudio se evidenció, que la línea celular Lulo con óptimas condiciones fisicoquímicas

en su medio de cultivo, es un sustrato eficiente para la infección con parásitos de *L. chagasi*, al igual, como se ha evidenciado en otras líneas celulares de insectos, puede ser útil en diversas aplicaciones, tales como: fisiología celular, bioquímica, inmunología y ciclos biológicos.

En todas las variables ambientales y fisicoquímicas del medio de cultivo, planteadas en el estudio, para evaluar los porcentajes de infección, se demostró que el día 6 postinfección, con la concentración de SFB al 5%, con pH a 6.8, osmolalidad de 320 mOsm/Kg y a temperatura de 26° C, se obtuvieron los mayores porcentajes.

La variable hemolinfa, aunque el porcentaje de infección registrado en el presente trabajo al 5% fue más alto que en ausencia de esta, produjo resultados más bajos que los obtenidos con el SFB, lo cual permite inferir que el parásito necesita otras sustancias ausentes en la hemolinfa, que puedan facilitar la diferenciación y transformación del patógeno.

Se determinó estadísticamente, que la variable osmolalidad, no es un parámetro que afecte significativamente el proceso de infección, al registrarse porcentajes uniformes, relativamente bajos en todas las concentraciones analizadas.

Se demostró que a temperaturas altas y pH bajos, hubo interferencia en el crecimiento y proliferación de la células, motivo por el cual, los parásitos no tuvieron a su disposición suficientes sustratos para efectuar el proceso de infección.

La comparación de los resultados obtenidos, al utilizar las variables ambientales y fisicoquímicas, durante el proceso de infección en el control positivo (células J774), mostró porcentajes más altos de infección en estas células, lo cual se explica por la capacidad de adaptación fisiológica que presentan como hospederas del parásito.

5; F 5897-A =9BHCG

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Colciencias (código: 1243-05-12416); a la Universidad de La Salle y al Instituto Nacional de Salud, por la financiación del presente trabajo.

A las doctoras Astrid Johanna Mejía y María Teresa Palau por la colaboración prestada en el desarrollo de la investigación.

Al Dr. César Díaz por el apoyo y asesoría en el análisis estadístico.

- Acero, V. y Galeano, E. Infección de Cultivos Celulares Derivados de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) con el Parásito *Leishmania chagasi*. Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Médicos Veterinarios. Universidad de La Salle. Bogotá, D.C. 2005.
- Alexander, J. Satoskar, A. Russell, D. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J cell Sci* 112 Pt 18. 1999.
- Aikawa, M, *et al.* Interactions between macrophagelike cells and *Leishmania braziliensis in vitro*. *Am J. Pathol* 1982.
- ATCC. Technical Information. Section IV: Technical Information. <<http://www.atcc.org/pdf/CellCatalog/TechnicalInfo.pdf>> 2003. Mayo 7 de 2004.
- Bates, P. *Infection of Phlebotomine sandflies with Leishmania*. London: Chapman & Hall, 1997.
- - -. Tetley, L. «Leishmania mexicana: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH». *Exp Parasitol* 76. (1993): 412.
- Bello, F. *et al.* «Iniciación de cultivos celulares primarios de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)». *Diógenes* 3, 2. (1996): 155-165.
- - -. *et al.* A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora confinnis* and its susceptibility to infection with some arboviruses. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* (2001): 865-873.
- Billingsley, P. Blood digestion in the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): partial characterization and post feeding activity of midgut aminopeptidases. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* (1990):149-63.
- Boulanger, N. *et al.* Characterization of a defensin from the sand fly *Plebotomus duboscqi* induce by challenger with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* (2004): 72(12): 7140-6.
- Chang, K. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts *in vitro*: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. *Am J. Trop Med Hyg* 27. (1978): 1084-1096.
- - -. *Leishmania donovani*: Promastigote-macrophage surface interactions *in vitro*. *Exp Parasitol* (1979): 175-189.
- - -. y Dwyer, D. «Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophage *in vitro*». *Science* 193 (1976): 678-680.
- - -. Chaudhuri, G. Fong, D. «Molecular determinants of *Leishmania* virulence». *Ann Rev Microbiol* 44. (1990): 499-529.
- Chiu, R. and Black, L. *Monolayer Cultures of insect cell lines and their inoculation with a plantivirus nature*. (1967): 1076-1078.
- Corte-real, S., Santos, C. y Meirelles, M. Differential expression of the plasma membrane Mg²⁺ ATPase and Ca²⁺ ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts *in vitro*. *J Submicrosc Cytol Parasitol Pathol.* (1995): 359-366.
- Darling, T. and Blum, J. *Changes in the Shape of Leishmania major Promastigotes in response to Hexoses, Proline, and Hypo-osmotic Stress*. *J. Protozool.* 37. (1990): 267-272.

- Dedet, J. Ryter, A. Vogt, E. Hosu, P. Pereira, D. Silva, L. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. *Ann Trop Med Parasitol* 77. (1983): 35-44.
- Dow, J. *pH gradients in lepidopteran midgut*. *Jexp. Biol.* 172 (1992): 355-275.
- Echalier, G. y Ohanessian. A. *Acad.Sc. Paris* 268 (1969): 1771-1773.
- Fampa, P. *et al.* Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. *Int. J. Parasitol* 33, (2003): 1019-1026.
- Hérvás-Rodríguez, J. *et al.* The *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts *in vitro*. *Veteri Pathol* 33. (1996): 469-473.
- Hsu, S., Li, S. y Cross, J. *Med. Entomol* 9 (1972): 86-91.
- Ilg, T. Harbecke, D. y Overath, P. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acid pH optimum. *FEBS Lett.* 327 (1993): 103-107.
- Jaffe, C. y Rachamim, N. Amastigote stage-specific monoclonal antibodies against *Leishmania major*. *Infect. Immun* 57 (1989): 3770-3777.
- Jiménez, M., Bello, F. y Ferro, C. «Iniciación de cultivos celulares primarios de *Lutzomyia shannoni* (Díptera: Psychodidae) y estudio cariológico preliminar». *Biomédica*; 17. 1. (1997): 82-83.
- Killick-Kendrick, R. The transmission of leishmaniasis by the bite of the sandfly. *J. Army Med Corps* 132, (1986): 134-140.
- - -. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the from infective to the vertebrate host. *Ann Paracitol Hum Comp* 65, (1990): 37-42.
- Kurttl, T. and Brooks, M. «J.G. Rodríguez (Ed.), *Insect and Mite Nutrition*». North-Holland, Amsterdam. (1972): 387-395.
- Lainson, R. Ryan, L. y Shaw, J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 82 3. (1987): 421 - 424.
- Landureau, J. y Jolles, P. *Exp. Cell. Res.* 54. (1969): 391-398.
- Leake, C. «Establishing primary cell culture from disease vectors and maintenance of continuous cell line», Crampton, J. Beard, C. Louis C. (eds), *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors*, Chapman & Hall, London (1997): 487.
- León, L. and Soares, M. Temporal RM Effects of temperature on promastigotes of several species of *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol*; 42 (1995): 219-223.
- Martínez-López, G. y Black, L. *In Vitro* 13 (1977): 777-784.
- Mattock, N. y Petters, W. The experimental chemotherapy of *leishmaniasis*. I: Techniques for the study of drug action in tissue culture. *Ann Trop Med Parasitol* 69. (1975): 349-356.
- Molyneux, D.H. and Killick-Kendrick, R. «Morphology, ultrastructure and life cycles in The *Leishmaniasis*». Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), *Biology and Medicine. Vol. I. Academic Press*, London (1986): 140-161.
- Oberlander, H. Growth and partial metamorphosis of imaginal disks of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *in vitro*. *Nature* 216 (1967):1140-1141.

- Pearson, R. Romito, R. Symes, P. Harcus, J. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human monocyte-derived macrophages: parasite entry, intracellular survival, and multiplication. *Infect Immun* 32 (1981): 1249-1253.
- Pessotti, J. *et al.* Interaction of *Leishmania (L) chagasi* with the Vero cell line. *Parasite* 11 (2004): 99-102.
- Ralph, P. and Nakoinz, I. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *J. Immunol.* 119 3 (1975): 950-954.
- Rey, G. Ferro, C. y Bello, F. Establishment and characterization of a New Continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with Arboviruses and *Leishmania chagasi* Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95 (2000): 103-110.
- Schwartzman, J. and Pearson, R. The interactions of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* 34 (1985): 850-855.
- Sohi, S. The effect of pH and osmotic pressure on the growth and survival of three lepidopteran cell lines. Kurstak/Maramorosch/Dübendorfer (eds) *Invertebrate Systems In Vitro*. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 1980.
- Walters, L. Chaplin, G. Modi, G. Tesh, R. «Ultrastructural biology of *Leishmania (viannia) panamensis* (*L. braziliensis panamensis*)» *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association, *Am J Trop Med Hyg.* 40 (1989): 19-39.
- Watanabe, H. Effect of the Concentration of Fetal Bovine Serum in a Culture Medium on the Susceptibility of *Bombix mori* Cells to a Nuclear Polyhedrosis Virus. *Appl. Ent. Zool* 22 3: (1987): 397-398.
- Yunker, C. Vaughn, J. Cory, J. Adaptation of an insect cell line (Grace's Antheria cells) to medium free of insect hemolymph. *Science* 155 (1967): 1565-1566.
- Zapata, A. Estudio de los Cultivos Celulares Derivados de *Lutzomyia spinicrassa*, (Diptera: Psychodidae) Caracterización y Susceptibilidad a la Infección con *Leishmania chagasi*. Trabajo presentado para optar al título de Magíster en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C., 2004.
- Zilberstein, D. y Shapira, M. The role of pH and Temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Ann. Reu. Microbiol.* 48 (1994): 449-470.