

Obtención y mantenimiento en cultivo de amastigotes axénicos de *Leishmania peruviana* y *Leishmania braziliensis*

Obtaining and maintenance in cultivation of axenic amastigotes of *Leishmania peruviana* and *Leishmania braziliensis*

Jesús Rojas Jaimes^{1,a}, Marco Mesía Guevara^{1,b}, Midori Chacón Cruzado^{1,c}

¹ Escuela de Medicina Humana, Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

^a Maestro en biología molecular, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6910-9341>

^b Maestro en docencia universitaria y gestión educativa, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4841-3624>

^c Estudiante de medicina humana, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9120-2094>

An Fac med. 2020;81(3):374-5. / DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v81i3.18862>

Correspondencia:

Jesús Rojas Jaimes
jesus.rojas.jaimes@gmail.com

Recibido: 5 de octubre 2020

Aprobado: 15 de diciembre 2020

Publicación en línea: 30 de diciembre 2020

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento:

Autofinanciado

Citar como: Rojas J, Mesía M, Chacón M. Obtención y mantenimiento en cultivo de amastigotes axénicos de *Leishmania peruviana* y *Leishmania braziliensis*. An Fac med. 2020;81(3): 374-5. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v81i3.18862>.

Sr. Editor,

Los parásitos del género *Leishmania* sp. adoptan las formas de promastigote y amastigote en su ciclo de vida. En busca de modelos parasitarios, un estudio utilizó amastigotes axénicos de *Leishmania mexicana* para probar nuevas drogas contra el parásito^(1,2). En el desarrollo de nuevas drogas es importante determinar su farmacodinamia, pudiendo actuar como metabolito secundario directamente sobre el parásito o como un compuesto modificado por la célula hospedera. En estos casos es de importancia el uso del modelo de amastigotes axénicos para conocer el efecto antiparasitario, destacando las ventajas de este modelo sobre los promastigotes que no es la fase que se encuentra en el humano y los amastigotes intracelulares que son más difíciles y costosos de mantener⁽³⁾. Se ha podido demostrar que la variación de pH y temperatura son claves en la conversión de promastigote a amastigote axénico^(4,5).

Presentamos los resultados de un estudio cuyo objetivo fue la obtención y sostenibilidad del cultivo de amastigotes axénicos de *L. peruviana* y *L. braziliensis* como modelos para futuros estudios sobre efectividad de drogas y fisiología del parásito.

Los promastigotes de la cepa referencial HB86 (*L. peruviana*) y LC53 (*L. braziliensis*) fueron cedidos por el Laboratorio de Patho-antígenos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los promastigotes procíclicos cedidos fueron inoculados 50 µL en pocillos de microplacas de 96 en una concentración de $2,34 \times 10^6$ /mL en 300 µL de medio Schneider, suplementados con suero bovino fetal al 20% y penicilina 10 000 U/estreptomina 10 mg/mL, usando diferentes pH (4,7- 5,2- 5,7- 6,2) a 35 °C, usando 3 repeticiones por cada pH. Las lecturas se realizaron cada 7 días por 1 mes usando un conteo microscópico de parásitos teñidos por el colorante Wright, usando 10 µL de cultivo fijado en lámina portaobjeto y cubriendo 100 campos.

El porcentaje de conversión por cada pocillo, usando 3 repeticiones para cada pH, se obtuvo usando la siguiente fórmula: número de amastigotes observados en 10 µL/ número de parásitos observados en 10 µL * 100, con el objetivo de determinar el pH óptimo donde se observó la total y más rápida conversión de promastigotes a amastigotes axénicos.

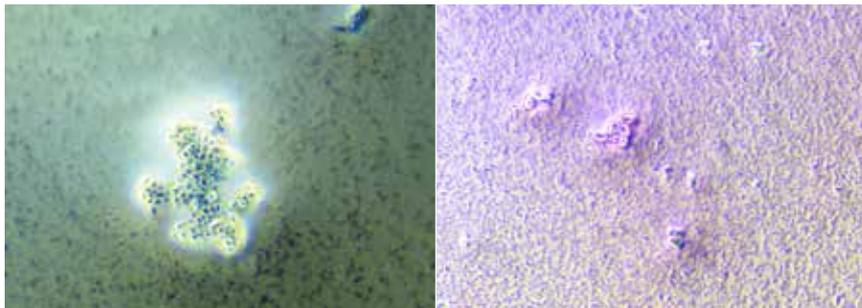


Figura 1. A la izquierda HB86 (*L. peruviana*) en mantenimiento a los 14 días a pH 4,7, visto al microscopio de contraste de fases, aumento 400X. A la derecha LC53 (*L. braziliensis*) en mantenimiento a los 14 días a pH 4,7, visto al microscopio de contraste de fases, aumento 400X.

Para el mantenimiento se tomó 50 μ L de medio de cultivo con parásitos (amastigotes axénicos del pH idóneo) y se agregó en 300 μ L de medio con el pH idóneo sin parásitos cada 7 días. La lectura se realizó cada 7 días por 176 días.

El único medio con la variable pH en la que existió 100% de conversión de promastigote a amastigote axénico, tanto para HB 86 como para LC 53, fue a pH 4,7, variando entre 63,7% al 7^º día, 97% al día 42^º y 100% al día 56^º. Manteniéndose al 100% de conversión hasta el día 176 para HB 86, 55,4% al día 7^º, 96,7% al día 14^º. Para LC53, 100% de conversión al día 56^º y hasta el día 176. La carga parasitaria a pH 4,7 estuvo entre 11661/ μ L al día 7^º, hasta 300/ μ L al día 56^º para HB 86; y entre 9769,5/ μ L al día 7^º, hasta 120/ μ L al día 56^º. Figura 1.

Aunque un estudio previo reportó la conversión de *L. braziliensis* en forma axénica, no se conoce por cuánto tiempo se pudo mantener esta forma *in vitro*; ya que de no estar conservada esta forma parasitaria, el efecto de las drogas contra el parásito podría estar sobreestimado⁽³⁾. Otro estudio previo mencionó la conversión del promastigote a amastigote axénico de *Leishmania peruviana*, aunque su uso fue la infección inmediata a nivel celular sin dilucidar si estos parásitos podrían ser viables en el tiempo en el medio axénico⁽¹⁾. En contraste, nuestro estudio logró mantener la forma axénica de *L. peruviana* y *L. braziliensis* al 100% al día 56 y manteniéndose hasta por 176 días donde terminó el estudio.

Concluimos que se obtuvo amastigotes axénicos de *Leishmania peruviana* y

Leishmania braziliensis con una conversión del 100% de promastigotes procíclicos a amastigotes axénicos al día 56^º, y que se mantuvo hasta el día 176^º a pH 4,7, a 35 C^º. Este hallazgo es de importancia para el estudio de drogas y la fisiología del parásito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González G, Castillo D, Estevez Y, Grentzinger T, Deharo E. Leishmania (Viannia) peruviana (MHOM/PE/LCA08): comparison of THP-1 cell and murine macrophage susceptibility to axenic amastigotes for the screening of leishmanicidal compounds. *Exp Parasitol.* 2009;122(4):353-6. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.05.005
2. Luis L, González-Luna D, Serrano ML, Orué A, Mendoza-León A. Evaluación de drogas en *Leishmania sp.*: Estudios moleculares y modelaje molecular de nuevos blancos. Glibenclamida: Efecto sobre la transformación *in vitro* de *Leishmania sp.* *Memorias del Instituto de Biología Experimental.* 2008;5:149-152.
3. Ríos YR, Otero AJ, Muñoz DL, Echeverry M, Robledo SM, Yepes MA. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Rev Colomb Cienc Quim Farm.* 2008;37(2):200-211.
4. Valencia G, Vera B, Flores A, Andrade F. Obtención de cultivo axénico de amastigotes de tres cepas de *Leishmania (Leishmania)* mexicana a partir de promastigotes aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada en México. *Rev bioméd.* 1998;9(4):206-13.
5. García A. Comparación de la susceptibilidad farmacológica *in vitro* de amastigotes de *Leishmania amazonensis* en distintos tipos celulares. *Recursos Educativos.* 2012;4(10):16.