

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



**VALIDACIÓN DE LA LINEA CELULAR THP-1 INFECTADA POR
AMASTIGOTES DE *LEISHMANIA* SPP. PARA LA EVALUACIÓN *IN*
VITRO DE SUSTANCIAS LEISHMANICIDAS**

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

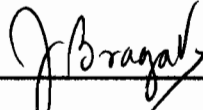
BSc. GERMÁN GONZÁLEZ ASPAJO

IQUITOS – PERÚ

2009

TESIS PARA OBTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

JURADO CALIFICADOR



Blga. Janeth Braga Vela. MSc.

PRESIDENTE



Blgo. Jorge Luis Marapara Del Águila. Dr.

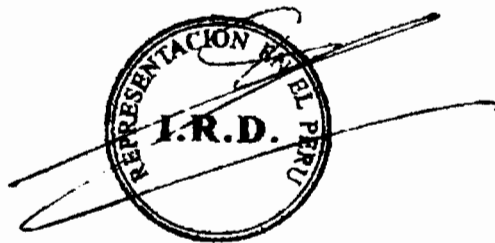
MIEMBRO



Blga. Blanca Díaz Bardales. Dra.

MIEMBRO

ASESORES



Dr. Eric Deharo

ASESOR EXTERNO

(Institut de Recherche pour le Développement)



Blgo. Juan Carlos Castro Gómez. MSc.

ASESOR INTERNO

(Universidad Nacional de la Amazonía Peruana)

DEDICATORIA

**A mis amados padres, José Germán González
y Edna Magdalena Aspajo por los consejos,
enseñanzas, apoyo, motivación y comprensión
que me brindan en todo momento**

**A mis hermanos Carlos, Ricardo y Daniel
por el respaldo y confianza que me
dan siempre**

AGRADECIMIENTOS

- A la Blga. Elsa Rengifo Salgado del Área de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) por la oportunidad brindada y la motivación constante.
- Al Dr. Michel Sauvain por aceptarme como integrante de su grupo de investigación en la búsqueda de compuestos derivados de productos naturales como potenciales agentes anti Leishmania.
- Al Dr. Eric Deharo por proponer la idea de buscar un modelo celular que permita minimizar el uso de animales en laboratorio y por su asesoramiento brindado en la realización y culminación de este trabajo de tesis.
- A la unidad mixta de investigación UMR 152 Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox. Institut de Recherche pour le Développement - Université Paul Sabatier, Université de Toulouse 3, Francia por financiar este trabajo de tesis.
- Al Joven Equipo Asociado al IRD (JEAI), cuya responsable es la Dra. Rosario Rojas Duran, que a través de su gestión se implementó el laboratorio en el cual se desarrolló el trabajo de tesis.

- Al Msc. Jorge Arévalo Zelada, por su gentil autorización para poder utilizar las cepas de *Leishmania* empleadas en este estudio.
- Al MSc.. Juan Carlos Castro Gómez por aceptar formar parte de este trabajo como asesor de tesis.
- A mis compañeros de trabajo MSc. Denis Castillo Pareja y Dr. Yannick Estévez por todo el apoyo que recibí de ellos en la realización y culminación del presente estudio.
- Al la Dra. Vanessa Aduai por su gentileza y aporte en la redacción de este manuscrito.
- Al Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú.
- Al Cooperación Técnica Belga (CTB), por apoyo a través de una beca para continuar con los estudios de Maestría el cual me permitirá seguir desarrollando más estudios sobre este tema.
- A todas la personas que colaboraron de una u otra forma en la culminación del presente estudio.

INDICE

	PAG.
I. INTRODUCCION.....	1
1. 1. Generalidades.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Ciclo Biológico y Ubicación Taxonómica.....	4
2.2 Respuesta Celular Del Hospedero Frente A Infecciones Con <i>Leishmania</i>	6
2.3. Importancia de la Leishmaniasis.....	7
2.4. Modelos Celulares en la Literatura.....	8
III. MATERIALES Y METODOS.....	11
3.1. Lugar de realización del estudio.....	11
3.2. Diseño Experimental.....	11
3.2.1. Evaluación de Compuestos Sobre Células Hospederas (citotoxicidad).....	12
3.2.2. Evaluación de Compuestos sobre macrófagos infectados con <i>Leishmania spp</i>	13
3.3. MATERIALES.....	14
3.3.1. Material Biológico.....	14
3.3.2. Cultivo <i>In Vitro</i>	14
3.3.2.1. Parásitos.....	14
3.3.2.2. Células THP-1.....	15
3.3.2.3. Macrófagos Peritoneales de Ratón.....	16
3.4. METODOLOGÍA.....	16
3.4.1. Cinética de Infección en Macrófagos Murinos y Células THP-1.....	16
3.4.2. Evaluación antileishmanicida de compuestos.....	17

3.4.2.1 En cultivos axénicos de amastigotes.....	17
3.4.2.2 En macrófagos infectados.....	18
3.4.2.3 Evaluación citotóxica de compuestos.....	18
3.5. Análisis de Datos.....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Evaluación de compuestos sobre el crecimiento de amastigotes axénicos de <i>Leishmania amazonensis</i>	20
4.2 Citotoxicidad sobre macrófagos murinos y la línea celular THP-1.....	20
4.3 Cinética de Infección en macrófagos murinos y la línea celular THP-1.....	22
A. Macrófagos peritoneales de ratón.....	22
B. Células THP-1.....	23
4.4 Evaluación de la actividad de los compuestos sobre macrófagos peritoneales de ratón y células THP-1 infectadas.....	25
4.4.1. Macrófagos peritoneales de ratón.....	25
4.4.2. Células THP-1.....	25
5. DISCUSION.....	28
6. CONCLUSIONES.....	32
7. RECOMENDACIONES.....	33
8. RESUMEN.....	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS.....	41
I. FOTOS.....	42
II. Cuadro de rango de los compuestos.....	46
A. Citotoxicidad: Macrófago de ratón.....	46

B. Citotoxicidad: Línea celular THP-1.....	47
III. FLUJOGRAMA.....	48
a) <i>Leishmania amazonensis</i>	48
b) <i>Leishmania peruviana</i>	49
IV. PROTOCOLOS.....	50
1). Extracción de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.....	50
2). Mantenimiento y Diferenciación de las células THP1.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ciclo biológico de *Leishmania* spp

Figura 02: Distribución Geográfica de las Especies de *Leishmania* en el Perú

Figura 03: Media del porcentaje de macrófagos murinos infectados con amastigotes axénicos de *Leishmania peruviana* y *Leishmania amazonensis*

Figura 04: Distribución de frecuencia de amastigotes por macrófago infectado a las 2, 24 y 72 horas post-infección entre *L. peruviana* y *L. amazonensis*

Figura 05: Media del porcentaje de células THP-1 infectadas con amastigotes axénicos de *L. peruviana*.

Figura 06: Media del porcentaje de células infectadas y valores de “p” obtenidos en dos modelos de macrófagos (murinos *versus* THP-1) infectados con amastigotes axénicos de la especie *L. peruviana* cepa LCA08.

LISTA DE TABLAS

Tabla I: Evaluación de Compuestos sobre el crecimiento amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis*

Tabla II: Evaluación de la Citotoxicidad de los Compuestos sobre Macrófagos

Tabla III: Porcentaje de reducción de la infección de macrófagos murinos infectados con amastigotes axénicos de *L. peruviana* (%IR) en presencia de los compuestos evaluados

Tabla IV: Porcentaje de reducción de la infección en macrófagos murinos infectados con amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (%IR) en presencia de los compuestos evaluados

Tabla V: Porcentaje de reducción de la infección en células THP-1 infectadas con amastigotes axénicos de *L. peruviana* (%IR) en presencia de los compuestos evaluados

Tabla VI: Evaluación de Compuestos sobre macrófagos infectados con amastigotes axénicos de *Leishmania* spp.

LISTA DE FOTOS

Foto 01: Manifestaciones clínicas de las lesiones producidas por *Leishmania* spp.

(A) Leishmaniasis cutánea

(B) Leishmaniasis muco - cutánea

Foto 02: Reacción con MTT

Foto 03: Cuantificación de macrófagos peritoneales de ratón con reactivo rojo neutral

Foto 04: Cuantificación de células THP-1 con reactivo azul de tripan

Foto 05: Macrófago de ratón infectado con *Leishmania amazonensis*

Foto 06: Línea celular THP-1 Infectado con *Leishmania amazonensis*

Foto 07: Lesiones producidas por *Leishmania amazonensis* en patas de ratones Balb/c

INDICE DE ABREVIATURAS

%IR	:	Porcentaje de reducción del índice de infección
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
Anf B	:	Anfotericina B
ATCC	:	American Type Culture Collection
CL	:	Leishmaniasis cutánea
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
h	:	Horas
IC50	:	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento de los parásitos
IR	:	Índice de infección
IR50	:	Reducción del 50% en el índice de infección
IRc	:	Índice de infección de las células tratadas
IRuc	:	Índice de infección de las células no tratadas
J774G8	:	Línea celular permanente de macrófagos
L ma CL1	:	<i>Leishmania amazonensis</i> clona 1
LCA 08	:	<i>Leishmania peruviana</i>
MAA	:	Medio para el crecimiento de amastigotes axénicos
MCL	:	Leishmaniasis mucocutanea
MTD	:	Dosis media tolerable
MTT	:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OD	:	Densidad óptica
p.i	:	Post infección
PBS	:	Buffer Fosfato Salino

PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PMA	:	Phorbol-12-myristate-13-acetate
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
SkE	:	Simalikalactona E
THP-1	:	Líneas celular pre-monocítica provenientes de pacientes con leucemia aguda
TNF	:	Factor tumoral de necrosis
VL	:	Leishmaniasis visceral

I. INTRODUCCION

1. 1. Generalidades

La leishmaniasis abarca un complejo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Estos parásitos se caracterizan por ser organismos dimórficos que presentan un estadio de cuerpo alargado y flagelado, denominado “**promastigote**” que habita generalmente en el tracto digestivo del vector y un estadio de forma redondeada no-flagelado denominado “**amastigote**”, que habita y se multiplica dentro de los fagolisosomas de los macrófagos del hospedero mamífero.

Tradicionalmente, la leishmaniasis ha sido clasificada en tres diferentes formas clínicas: leishmaniasis visceral (VL), leishmaniasis cutánea (CL) y leishmaniasis mucocutánea (MCL), las cuales presentan distintas inmunopatologías y grados de morbilidad y mortalidad (Croft and Coombs 2003). Este espectro de enfermedades se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, principalmente en las zonas tropicales y sub-tropicales de cuatro continentes: América central y del Sur, África, Asia y el Sur de Europa (anillo mediterráneo) [WHO]. Cerca de 350 millones de personas viven en riesgo de contraer alguna forma de Leishmaniasis y aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas por diferentes especies de *Leishmania* [WHO, 1993], se estima que esta enfermedad es responsable de más de 80, 000 muertes por año y 2 millones de nuevos casos son registrados por año [Brodie *et al.*, 2007].

A pesar que, actualmente la leishmaniasis es considerada una “enfermedad olvidada”, en los últimos años se ha observado un preocupante incremento en el número de casos en diferentes países, entre ellas Brasil, cuya incidencia de leishmaniasis cutánea se ha incrementado de 21800 casos en 1998 a 60000 casos en el año 2003. Es así que la leishmaniasis se ha convertido en un serio problema de salud pública en países tropicales de América Latina, entre los cuales se cuentan Perú, Bolivia, Colombia, Venezuela y algunos países centroamericanos [WHO, 2004].

En el Perú, el área endémica alcanza el 74% del territorio nacional afectando a 12 departamentos y es la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis [Sanchez, *et al.*, 2004].

En humanos, se han descrito aproximadamente 20 especies y subespecies de *Leishmania*, de las cuales once se han reportado en el Nuevo Mundo [Schreiber, 1987]. En el Perú encontramos dos formas clínicas de Leishmaniasis: la Uta o “Leishmaniasis cutánea andina”, causada principalmente por *L. (Viannia) peruviana*, la cual genera úlceras en la piel y es común en los Andes y valles interandinos sobre los 1300 a 2800 m. s. n. m. ; y la Espundia o Leishmaniasis mucocutánea, encontrada principalmente en la Selva y conocida como “Leishmaniasis Selvática”, causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* [Davies, *et al.*, 1997; Grimaldi, *et al.*, 1993; Lucas, *et al.*, 1998].

En la actualidad, la mayor parte de los estudios sobre evaluación de compuestos derivados de productos sintéticos o de plantas medicinales frente a infecciones causadas por *Leishmania* spp. se han realizado en modelos de ratón, adecuados a las diferentes formas clínicas con que se presenta la infección, como por ejemplo:

- El modelo *in vivo*, infecciones en animales.
- El modelo *in vitro*, en el cual se realizan cultivos continuos de células para su mantenimiento y posterior uso.
- El modelo *ex vivo*, que requiere de la extracción de macrófagos peritoneales de ratón para realizar infecciones de los mismos.

Existen diferentes tipos de líneas de macrófagos que se vienen usando en modelos de infección [Maia, *et al.*, 2007] para la obtención de amastigotes intracelulares. Se ha descrito el uso de cultivos de células como: macrófagos derivados de sangre periférica, macrófagos de médula ósea, macrófagos peritoneales de ratón y líneas celulares en experimentos de infecciones con leishmania [Gebre-Hiwot, *et al.*, 1992].

Los modelos de líneas celulares permiten mantener a las células bajo condiciones similares a las fisiológicas de forma estable; en los ensayos se modifica únicamente las variables de interés. Además que, las líneas celulares ofrecen la ventaja de ser fáciles de manipular y mantener en los medios de cultivo.

Por otro lado, los estudios *in vivo* y *ex vivo* requieren el uso de animales. Si bien la experimentación animal es una de las piezas fundamentales en la biomedicina e investigación, se debe tener siempre en consideración que en toda experimentación en la que se manipule animales debe aplicarse la Regla de las 3 R: “Reducción, Refinamiento, Reemplazo” de las siglas en inglés “Reduce, Refine, Replace” [Barassi, *et al.*, 1996].

La importancia de buscar un modelo basado en una línea celular, es que nos proporciona un recurso ilimitado y uniforme de células hospederas [Gebre-Hiwot, *et al.*, 1992], pudiendo facilitar estudios bioquímicos e inmunológicos sobre amastigotes y ser usado en evaluaciones de drogas antiparasitarias [Ogunkolade, *et al.*, 1990]. Por otro lado, la validación de este modelo de infección contribuirá en minimizar el uso de animales de laboratorio cuando se realicen estos tipos de ensayos.

Por tal motivo y como objetivo principal del presente trabajo, se buscó establecer y/o estandarizar un tipo de macrófago para ser usado como modelo *in vitro* en estudios quimioterapéuticos antileishmania, y también, con el propósito de minimizar el uso de animales de experimentación. Se analizó la susceptibilidad de la línea celular THP-1 (derivada de pacientes con leucemia aguda) frente a infecciones con dos especies de *Leishmania* (*L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) peruviana*) y se comparó con el modelo de macrófagos peritoneales de ratones (modelo de ratón).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICLO BIOLÓGICO Y UBICACIÓN TAXONÓMICA

Durante el ciclo biológico (Figura 01), el parásito del género *Leishmania* presenta dos formas que se desarrolla en un hospedero diferente: una forma flagelada extracelular conocida como promastigote y una forma intracelular conocida como amastigote. Las formas que infectan a ambos (hombres y otros vertebrados hospederos) es la forma promastigote que vive en el tracto digestivo del insecto vector (género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y géneros *Lutzomia* y *Psychodopygus* en el Nuevo Mundo). La transmisión a un hospedero mamífero se produce cuando el vector inocula promastigotes metacíclicos (estadio infeccioso del parásito desarrollado en el interior del vector) al momento de alimentarse. Seguidamente, los promastigotes son rápidamente fagocitados por los macrófagos del hospedero, donde se diferenciarán a la forma amastigote. Las manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis son consecuencia de la multiplicación de los amastigotes dentro de los macrófagos [Chan-Bacab, *et al.*, 2001; Ismaeel, *et al.*, 1998].

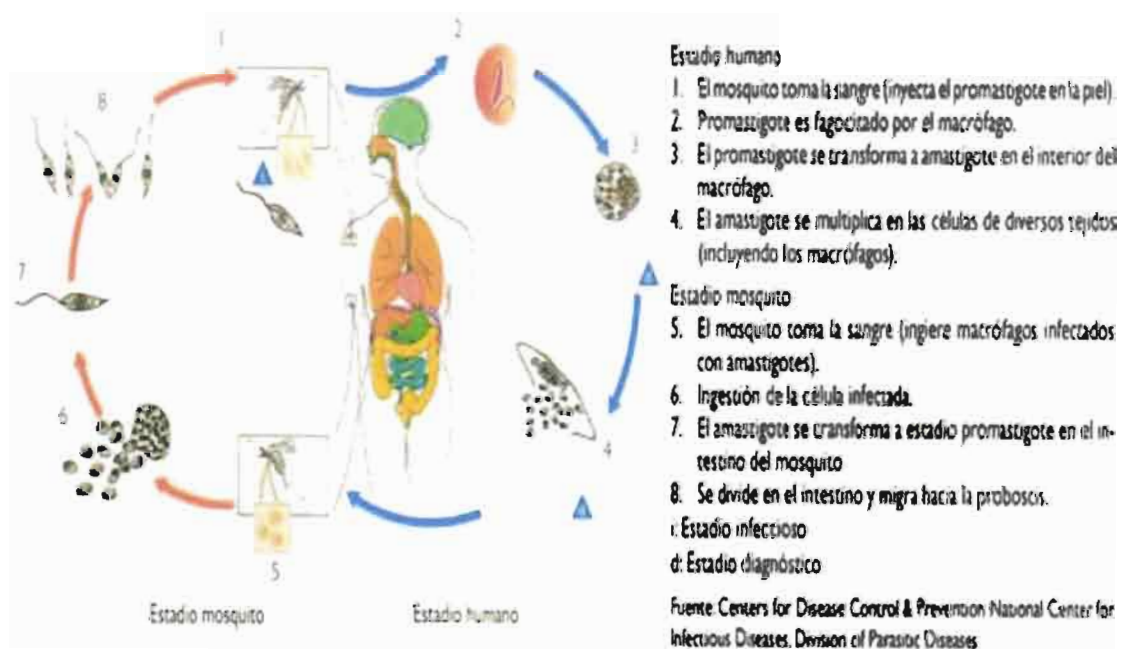


Figura 01: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Sánchez *et al.* 2004)

Las primeras clasificaciones taxonómicas de las especies de *Leishmania* se basaron en diferentes criterios como: el patrón clínico de la enfermedad, la distribución geográfica, especies de reservorios, comportamiento en hámster y en cultivos in vitro [Lainson, *et al.*, 1979-a; Lainson *et al.*, 1979-b; Lainson, *et al.*, 1979-c]. Posteriormente, se desarrollaron diversas técnicas en bioquímica, inmunología y biología celular que permitieron confirmar muchas de las especies y subespecies de *Leishmania*, clasificadas por los criterios previos. Estas técnicas incluyen: el análisis de isoenzimas, anticuerpos monoclonales, hibridización con sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Barker, *et al.*, 1983; Mendoza-Leon, *et al.*, 2002; Miles, *et al.*, 1985].

A continuación se resume la posición sistemática y la clasificación del género *Leishmania* [Mendoza-Leon, *et al.*, 2002].

Reino	:	Protista Haeckel, 1866
Sub Reino	:	Protozoa Golfuss, 1817
Phylum	:	<i>Sarcomastigophora</i> , Honigberg & Balamuth, 1963.
Sub-phylum	:	<i>Mastigophora</i> , Deising, 1866.
Clase	:	<i>Zoomastigophorea</i> , Calkins, 1909.
Orden	:	<i>Kinetoplastida</i> , Honigberg, 1963 emed Vickerman, 1976.
Suborden	:	<i>Trypanosomatina</i> : Kent, 1880.
Familia	:	<i>Trypanosomatidae</i> : Doflein, 1901, emed Grobben, 1905.
Género	:	<i>Leishmania</i> .
Sub-género	:	<i>Leishmania</i> (L.) y <i>Viannia</i> (V).

Dentro de la taxonomía, las especies de *Leishmania* están agrupadas dentro de complejos [Mendoza-Leon, *et al.*, 2002], de los cuales conocemos:

Complejos

Donovani	Tropica	Mexicana	Hertigi	Braziliensis
Especies				
<i>L. (L.) donovani</i>	<i>L. (L.) tropica</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) hertigi</i>	<i>L. (V.) brasiliensis</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) deanei</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>
<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (L.) pifanoi</i>		<i>L. (V.) panamensis</i>
<i>L. (L.) archibaldi</i>	<i>L. (L.) gerbilli</i>	<i>L. (L.) garhami</i>		<i>L. (V.) guyanensis</i>
<i>L. (L.) venezuelensis</i>		<i>L. (L.) venezuelensis</i>		<i>L. (V.) tainsoni</i>
		<i>L. (L.) aristedesii</i>		<i>L. (V.) shawi</i>
		<i>L. (L.) enriettii</i>		<i>L. (V.) equatorensis</i>
				<i>L. (V.) colombiense</i>

2. 2. RESPUESTA CELULAR DEL HOSPEDERO FRENTE A INFECCIONES CON LEISHMANIA

La leishmaniasis se caracteriza por un espectro de fenotipos que se corresponden con la fuerza de la respuesta inmune mediada por células por parte del hospedero. Dentro de las poblaciones humanas existen fenotipos susceptibles y resistentes. La enfermedad varía desde formas caracterizadas por pocas lesiones que curan espontáneamente a enfermedad interna o externa hasta un severo compromiso de membranas mucosas. Las lesiones que curan espontáneamente están asociadas con una respuesta positiva de la célula T antígeno específica, la forma visceral y cutánea difusa con una respuesta débil o ausente de la célula T y la enfermedad mucocutánea con una hiperrespuesta de la célula T (Farah, *et al.*, 1997; Grevelink, *et al.*, 1996). El sistema inmune del hospedero tiene un rol inmunorregulatorio en la expresión de la enfermedad. En la leishmaniasis cutánea localizada las principales citoquinas producidas son la IL-2 y el interferón gama y en la mucocutánea y la cutánea difusa, la IL-4 y la IL-10. Esto se correlaciona bien con estudios en modelos de ratón, en los que la producción de IL-2 e interferón gama (TH1) interviene en la curación de la enfermedad, mientras que la de IL-4 y IL-10 (TH2) está asociada con progresión y diseminación de la enfermedad. Así, dos subpoblaciones de células T helper en

el sistema inmune de ratón son críticos en la inducción de la resistencia o la susceptibilidad a la infección: TH1 y TH2 (Farah, *et al.*, 1997; Grevelink, *et al.*, 1996, Herwaldt, *et al.*, 1998).

2.3 IMPORTANCIA DE LA LEISHMANIASIS

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades de evolución crónica que se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras de acuerdo a la especie de *Leishmania* causante y la respuesta inmune del hospedero.

En el Perú, la Leishmaniasis representa un importante problema de salud pública por los altos costos que representa a nivel psicológico, socio-cultural y económico [INS, 2000] y el área endémica alcanza el 74% del territorio nacional afectando a 12 departamentos y es la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis [Sanchez, *et al.*, 2004].

En nuestro país, se tienen cinco especies reportadas hasta la actualidad (**Figura 02**). En la región amazónica, tres especies han sido reconocidas como agentes de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea conocida como leishmaniasis selvática o espundia: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*, siendo esta última la de mayor importancia clínica y epidemiológica en la zona. (Lucas, *et al.*, 1998).



Figura 02: Distribución Geográfica de las Especies de Leishmania en el Perú. [Sanchez, *et al.*, 2004].

La leishmaniasis cutánea andina (Uta) es causada por *L. (V.) peruviana*; esta especie es endémica en el Perú en áreas entre 800 a 3000 msnm, inclusive se ha reportado su presencia hasta los 600 msnm. La incidencia también varía con la latitud, presentándose hasta los 13° de latitud sur. Esta especie no es transmitida en la zona amazónica [INS, 2000].

2. 4. MODELOS CELULARES EN LA LITERATURA

Benaim *et al.*, (<http://asmcourse.ivic.ve/papers/ivic/benaim.pdf>). Evaluaron el efecto de la Amiodarona sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana*. Los autores utilizaron la línea celular permanente de macrófagos J774G8. También realizaron la infección de macrófagos J774G8 con promastigotes de *Leishmania mexicana* para la evaluación de la viabilidad mediante la técnica de microscopía confocal.

Dasgupta et al., 2003. Realizaron la infección de fagocitos mononucleares humanos (macrófagos de sangre periférica) y macrófagos de la línea de células THP-1 con promastigotes de *Leishmania donovani*. Los autores obtuvieron 96% de infección en células THP-1 después de 12 horas de ataque (enfrentar los parásitos con las células hospederas); de igual manera, para los fagocitos mononucleares de humano con 96% de infección después de 2 horas de ataque. El número de parásitos intracelulares fue menor cuando utilizaron las células humanas.

Davis and Kedzierski, 2005. Investigaron varios productos con actividad leishmanicida como las quinonas, alcaloides, terpenos, saponinas, derivados fenólicos y otros metabolitos secundarios, derivados de extractos naturales de plantas, sobre modelos de infección cutánea y visceral, y determinaron que los compuestos con actividad antileishmania mas prometedores son los alcaloides (ej. benzoquinolizidine), los terpenos (diterpenoides y sesquiterpenos), y fenoles o naftoquinonas; todos estos metabolitos secundarios son aislados de plantas naturales.

Di Giorgio et al., 2000. Utilizaron la línea celular THP-1 y macrófagos peritoneales del ratón, los cuales infectaron con amastigotes de tres especies: *L. infantum*, *L. donovani* y *L. mexicana*. Las células infectadas con amastigotes marcados con un anticuerpo monoclonal fueron tratadas con las drogas Antimoniato de Meglumina, Anfotericina B, Pentamidina y Alopurinol. La cuantificación de la infección fue realizada mediante la técnica de Citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos del lipofosfoglicano de *Leishmania* sp. y por la técnica convencional de microscopía. Los autores demostraron que esta técnica de citometría de flujo da resultados confiables de la actividad de compuestos antileishmania convencionales y puede ser una herramienta muy útil para evaluar muchas drogas con potencial antileishmánico.

Gebre-Hiwot et al., 1992. Elaboraron un modelo in vitro para la evaluación de drogas antileishmania usando monocitos de la línea celular THP-1 y macrófagos peritoneales de ratón, los que fueron infectados con promastigotes en fase estacionaria de tres especies de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. aethiopica*, y *L. infantum*, los autores encontraron porcentajes de infección elevados de 85% en *L. donovani* y 75% en *L. aethiopica*, y ellos concluyen que los resultados obtenidos de los ensayos con THP-1 y macrófagos peritoneales de ratón fueron similares en ambos modelos.

Mesquita et al, 2005. Evaluaron in vitro 31 extractos derivados de plantas medicinales de Brasil, para determinar su actividad antiprotozoaria frente a promastigotes de *Leishmania donovani*, y amastigotes de *Trypanosoma cruzi*; obteniéndose de los 31 extractos evaluados, solo 15 extractos fueron activos, y concluyen que el fraccionamiento de los extractos más activos está en progreso, para identificar el compuesto antiparasitario responsable de dicha actividad.

Monzote et al., 2004. Evaluaron sobre macrófagos peritoneales de ratones Balb/c los efectos antiproliferativos de nuevos derivados de thiadiazine frente a amastigotes de *Leishmania amazonensis*. Los compuestos derivados de thiadiazine fueron activos frente a amastigotes del parásito, inhibiendo su crecimiento hasta en un 89%, lo cual podría ser considerado como un potencial compuesto antileishmánico.

Sereno and Lemesre, 1997. Utilizaron cultivos de amastigotes axénicos para comparar la actividad de siete drogas, incluyendo las usadas actualmente en el tratamiento de leishmaniasis, frente a amastigotes axénicos y formas promastigotes de tres especies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. mexicana*), responsables de la leishmaniasis difusa, cutánea y visceral, respectivamente. Demostraron el potencial de usar cultivos axénicos de amastigotes en lugar de promastigotes en el tamizaje de drogas, debido a que los primeros permiten una detección más temprana de la actividad antileishmania de las drogas.

III. MATERIALES Y METODOS

3. 1. Lugar de realización del estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de Tripanosomátidos del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” (IMTAvH) y en la Unidad de Parasitología Celular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima-Perú.

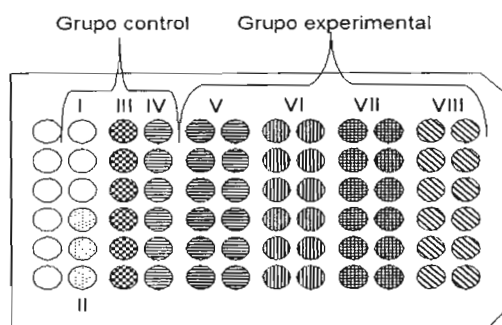
3. 2. Diseño Experimental

En el presente estudio se evaluó la actividad de 8 compuestos: 7 derivados de síntesis química llamados L. 106. 03, L. 106. 04, L. 106. 05, L. 106. 06, L. 406. 15, L. 606. 09, L. 606. 10, brindados gentilmente por el Profesor Ignacio Aldana de la Universidad de Navarra-Pamplona, España, todos estos compuestos pertenecen a la familia química QUINOXALINAS, también se evaluó 1 compuesto de origen natural llamado SkE extraído de la planta *Quassia amara* perteneciente a la familia botánica SIMAROUBACEAE (gentilmente brindada por la Dra. Valérie Jullian de la Facultad de Farmacia de la Universidad Toulouse - Francia); estos compuestos fueron evaluados contra 2 especies de *Leishmania*: (*L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) peruviana*). Se ensayó también la actividad de 1 molécula de referencia en el tratamiento de Leishmaniasis, (Anfotericina B).

Para esto, se realizaron ensayos de: (i) tamizaje, que consistieron en evaluar el efecto que producen los compuestos, arriba mencionados, sobre amastigotes axénicos de *L. (L.) amazonensis*, para determinar la concentración inhibitoria media (IC50) de los compuestos; (ii) citotoxicidad, en los cuales se determinó el efecto que producen los compuestos al ser enfrentados sobre las células hospederas (línea celular THP-1), para de esta manera conocer la dosis media tolerable (MTD) de los compuestos; y (iii) macrófago infectado (con las 2 especies de *Leishmania* arriba mencionadas), para determinar la efectividad de los compuestos en amastigotes intracelulares (la forma clínica relevante) y la concentración a la cual los parásitos mueren sin afectar a las células que los hospedan. Para obtener datos confiables, cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

La realización del experimento se hizo siguiendo el diseño propuesto a continuación:

3. 2. 1. Evaluación de Compuestos Sobre Células Hospederas (citotoxicidad):



Donde:

- I = Medio Solo
- II = Macrófago solo
- III = Macrófago + Droga de referencia (Anfotericina B)
- IV = Macrófago + DMSO (Diluyente de los compuestos)
- V = Macrófago + Compuestos a evaluar
- VI = Macrófago + Compuestos a evaluar
- VII = Macrófago + Compuestos a evaluar
- VIII = Macrófago + Compuestos a evaluar

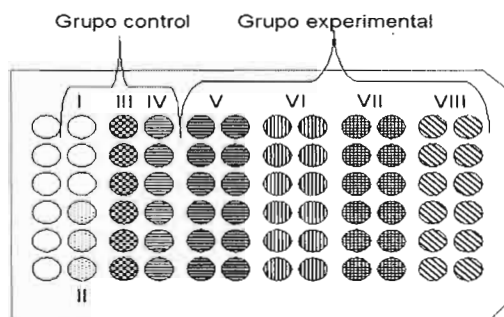
Y de acuerdo con el siguiente cuadro:

Variables o tratamientos	Grupo control	Unidades experimentales	
	Para ambos Tipos Celulares	MØ peritoneal de ratón	Línea celular THP-1
Efecto de los compuestos a 4 concentraciones:	sin compuesto	[100 - 0. 1] µg/ml	[100 - 0. 1] µg/ml

Control Interno del Ensayo

Efecto de la droga de referencia (Anfotericina B)	10; 1 µM
Efecto del diluyente de los compuestos (DMSO)	100; 10 µg/ml

3. 2. 2. Evaluación de Compuestos sobre macrófagos infectados con *Leishmania* spp.



Donde:

- I = Macrófago sin infectar
- II = Macrófago Infectado solo
- III = Macrófago Infectado + Droga de referencia (Anfotericina B)
- IV = Macrófago Infectado + DMSO (Diluyente de los compuestos)
- V = Macrófago Infectado + Compuestos a evaluar
- VI = Macrófago Infectado + Compuestos a evaluar
- VII = Macrófago Infectado + Compuestos a evaluar
- VIII = Macrófago Infectado + Compuestos a evaluar

Y de acuerdo con el siguiente cuadro:

Variables o tratamientos	Grupo control	Unidades experimentales	
	Para ambas células hospederas	MØ peritoneal de ratón	Línea celular THP-1
% de Infección con:	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
	<i>L. (V.) peruviana</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>
Efecto de los compuestos a 4 concentraciones:	sin compuesto	[100 - 0.1] µg/ml	[100 - 0.1] µg/ml

Control Interno del Ensayo

Efecto de la droga de referencia (Anfotericina B)	10; 1 µM
Efecto del diluyente de los compuestos (DMSO)	100; 10 µg/ml

3. 3. MATERIALES

3. 3. 1. Material Biológico

- *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/76/LTB-012.
- *Leishmania peruviana* MHOM/PE/--/LCA08.
- Ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad, obtenidas del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los animales se mantuvieron en jaulas de policarbonato transparente, con agua y comida *ad libitum*, en un ambiente con temperatura de 22°C +/- 1°C y una humedad relativa de 50 a 60%.
- Línea celular THP-1 (Células pre – monocíticas), gentilmente donadas por el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3. 3. 2. Cultivo In vitro

3. 3. 2. 1. Parásitos

Leishmania (Leishmania) amazonensis (cepa MHOM/BR/76/LTB-12), aquí referida como *L. amazonensis*, fue mantenida como amastigotes axénicos a 32 °C, con 5 % CO₂, con sub-pasajes cada 4 días para obtener parásitos en fase de crecimiento exponencial. El cultivo fue iniciado con un inóculo de 3 x 10⁶ amastigotes en medio de cultivo MAA (medio para el crecimiento de amastigotes axénicos) suplementado con 20% de suero fetal bovino (DE 14-801F, BioWhitaker Cambrex) en frasco de cultivo celular de 25 cm² [Lemesre, 1994], (patente PCT/FR 94/00577).

Leishmania (Viannia) peruviana (cepa MHOM/PE/--/LCA08), aquí referida como *L. peruviana*, fue mantenida en estadio promastigote en un medio bifásico, compuesto de una fase de agar sangre y una fase de 0. 89% NaCl (Sigma) a pH 7. 4 y 24°C en una atmósfera normal (sin CO₂), con sub-pasajes cada 4 días. El cultivo de promastigotes fue realizado en 5 mL de medio M199 (Invitrogen), pH 7. 4, suplementado con 10% de suero fetal bovino (DE 14-801F, BioWhitaker Cambrex), en un frasco de cultivo celular de 25 cm². El cultivo se inició con un

inóculo de 5×10^6 promastigotes, en fase de crecimiento exponencial, alcanzando la fase estacionaria después de 4 días de incubación a 24°C en una atmósfera normal (sin CO₂) [Serenio, *et al.*, 2007]. Los promastigotes en fase estacionaria de la curva de crecimiento fueron centrifugados por 10 minutos, a 1500 g (4°C), el sobrenadante fue descartado y reemplazado por 5 mL de medio M199, pH 5.5, suplementado con 20% suero fetal bovino en un frasco de cultivo celular de 25 cm². La transformación a amastigotes axénicos se logró incubando los frascos de cultivo celular de 25 cm² a 34°C por 96 horas en una atmósfera normal [Serenio & Lemesre, 1997-a].

3.3.2.2. Células THP-1

La línea celular monocítica THP-1 (ATCC TIB-202), fue mantenida en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 5 mM L-Glutamina (Sigma), 100 U/mL penicilina (Sigma) y 100 µg/mL estreptomycin (Sigma), y 10% suero fetal bovino, a 37°C, 5% CO₂ en frascos de cultivo celular de 25 cm² con sub-pasajes cada 2 días [Worley, *et al.*, 2003]. Para los experimentos, las células fueron centrifugadas por 10 minutos a 200 g (4°C), el sobrenadante fue descartado y reemplazado por medio fresco. La determinación de la concentración y la viabilidad se realizaron usando el método de exclusión del colorante azul de tripán (Sigma); las células íntegras excluirán dicho colorante. La concentración celular se ajustó a 2×10^4 células/pozo y luego se adicionaron 50 µL en las microplacas de 96-pozos, sobre laminillas cubre-objeto (cover glasses N°2) estériles cortadas en un tamaño de 4 x 4 mm [Castillo, *et al.*, 2007]. Posteriormente en cada placa, se adicionaron 50 µL de medio completo fresco con 80 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma) y las placas se incubaron por 48 horas a 37°C, 5% CO₂ para permitir la diferenciación celular a macrófagos [Park, *et al.*, 2007]. Transcurrido este tiempo, las placas fueron lavadas dos veces con medio RPMI 1640 pre-temperado, y finalmente se colocaron 100 µL de medio completo RPMI 1640 por pozo.

3. 3. 2. 3. Macrófagos Peritoneales de Ratón

Los macrófagos peritoneales de ratón fueron cosechados de la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad en medio M199 (frío), suplementado con 10% de suero fetal bovino [Moretti, *et al.*, 1993]. La viabilidad y la concentración de células recuperadas fue determinada por el método del colorante rojo neutro (Sigma) (esté método se utilizó para discriminar entre los macrófagos y otras células, debido a que solo los macrófagos fagocitaran este reactivo (debido a su propiedad fagocítica de estas células) tornándose de un color rojo a rosado. Los macrófagos peritoneales de ratón fueron colocados sobre laminillas (dispuestas previamente una por pozo) en las microplacas de 96-pozos y luego fueron incubados a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO₂ por 24 h. Las células no-adheridas fueron removidas lavando dos veces con medio M199 pre-temperado, y seguidamente se colocaron 100 µL de medio completo M199 por pozo.

3.4. METODOLOGÍA

3. 4. 1. Cinética de Infección en Macrófagos peritoneales de Ratón y Células THP-1

El proceso de infección se realizó reemplazando el medio de cultivo antiguo de los macrófagos peritoneales de ratón ó de las células THP-1, por amastigotes en suspensión (de *L. peruviana* ó *L. amazonensis*) en medio M199 y/o RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino respectivamente, usando para macrófagos peritoneales de ratón una proporción de infección de 3: 1 y para células THP-1 una proporción de infección de 10: 1 amastigotes/células respectivamente, durante 2 horas a 32°C en 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de infección, se hicieron tres lavados con medio simple M199 y/o RPMI 1640 pre-temperado para remover los parásitos libres, luego se adicionaron 100 µL de medio completo. El nivel de parasitemia se midió a diferentes tiempos post- infección (p. i) (0, 2, 12, 24, 48, 72 horas p-i). Las células adheridas a las laminillas fueron fijadas con metanol absoluto, teñidas con Giemsa (GS1L-1L, Sigma) y examinadas bajo la luz del microscopio. El número de amastigotes intracelulares se determinó por conteo de amastigotes en 300 células en tres diferentes pozos.

3.4.2. Evaluación antileishmania de compuestos

3.4.2.1. En cultivos axénicos de amastigotes

Para determinar la concentración inhibitoria media de los compuestos, se usó el micrométodo enzimático descrito por [Serenó & Lemesre, 1997-a]. Se colocaron 100 μ l (2×10^6) de amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* en fase de crecimiento logarítmico por pozo en una microplaca de 96 pozos de fondo plano. Luego se adicionaron los compuestos, disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), a una concentración final entre 100 a 0, 1 μ g/ml. La concentración final máxima de DMSO fue de 1% en todos los experimentos realizados. El compuesto de referencia usado fue Anfotericina B (lote A2411, Sigma) [Serenó & Lemesre, 1997-a; Sereno & Lemesre, 1997-b] a una concentración de 10 μ M y 1 μ M y DMSO a una concentración de 1% y 0, 1%. Después de 72 h de incubación a 32°C en una atmósfera con 5% CO₂, se agregaron 10 μ l de MTT (10 mg/ml; Sigma) a cada pozo y las placas fueron incubadas a las mismas condiciones por 4 h. La reducción enzimática de las moléculas de MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] por enzimas deshidrogenasas mitocondriales (presentes en los parásitos viables) se evidencia por la formación de una sal de color azul insoluble llamada Formazán. La reacción fue detenida adicionando 100 μ l de 50% isopropanol (Sigma)-10% dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma) e incubando por unos 30 minutos, bajo agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la densidad óptica a 595 nm, con el lector de microplacas - ELISA (Modelo. 3550, Bio-Rad).

El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{OD control} - \text{OD compuestos})}{\text{OD control}} \times 100 = \% \text{ de inhibición}$$

La dosis inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito (IC₅₀) fue calculado con el programa Probit.

3. 4. 2. 2. En macrófagos infectados

Los macrófagos peritoneales de ratón y/o las células THP-1 por separado, fueron infectados como se ha descrito en la sección anterior (Cinética de Infección en Macrófagos peritoneales de ratón y Células THP-1). Los compuestos a ser ensayados, disueltos en DMSO, fueron agregados en el medio a una concentración final determinada previamente por los ensayos de tamizaje sobre amastigotes y de citotoxicidad. Se incubó por 48 horas, luego se hizo una evaluación para comparar la actividad antiparasitaria en los dos modelos celulares de infección. Las células fueron fijadas con metanol absoluto, teñidas con Giemsa y examinadas bajo el microscopio a 100X. El número de amastigotes intracelulares fue determinado por conteo de 300 macrófagos. El índice de infección (IR) fue obtenido al multiplicar el porcentaje de macrófagos infectados por el número de amastigotes por macrófagos [Delorenzi, *et al.*, 2001].

3. 4. 2. 3. Evaluación citotóxica de compuestos

Principio: Los macrófagos peritoneales de ratón y/o las células THP-1 diferenciadas a macrófagos son tratados con diluciones de cada compuesto y se compara la viabilidad de ambos ensayos con el método de exclusión del colorante azul de tripán. La exclusión de dicho colorante por las células vivas es visible bajo la luz del microscopio óptico con un objetivo de 40X, seguido de la determinación y comparación de la citotoxicidad de la actividad de los compuestos [Castillo, *et al.*, 2007].

Procedimiento: Los macrófagos peritoneales de ratón (extraídos 24 h previo al ensayo) y/o las células THP-1 (a las 48 h post-diferenciación con PMA) se adhirieron sobre laminillas dentro de las microplacas de 96-pozos, y fueron incubados por 24 h a 37°C en 5% CO₂. Se hicieron diluciones seriadas de los compuestos en un rango entre 100 µg/ml - 0.1 µg/ml; éstas fueron añadidas en medio completo a un volumen final de 100 µL y luego las células retornaron al cultivo por 48 h. Los controles fueron Anfotericina B a una concentración de 10 y 1 µM y DMSO a una concentración de 0, 1% y 1%. Después de la incubación, las laminillas fueron puestas sobre el hemocitómetro de Neubauer con 0.4% de una solución de azul de tripán en PBS 0.01M, y se determinó el número de células viables en cada laminilla a 40 X de aumento en un microscopio de

luz óptica. Para cada compuesto y tipo de célula, el IC50 fue determinado usando el método descrito por [Serenó & Lemesre, 1997-b].

3. 5. Análisis de Datos

Los resultados fueron analizados para calcular el %IR y el IR50 de la siguiente manera:

El porcentaje de reducción del índice de infección (%IR) en comparación con los controles (no tratados) [$\%IR = 100 - (\text{índice de infección de las células tratadas (IRc)} / \text{índice de infección de las células no tratadas (IRuc)} \times 100)$] y el IR50 fue calculado como la dosis capaz de reducir el 50% de la infección del macrófago (reducción del 50% en el índice de infección dado por los 2 parámetros: porcentaje de infección y número de amastigotes/macrófago) y calculado con la fórmula de tendencia de la hoja de cálculo Excel. Los resultados fueron analizados con el test estadístico ANOVA, utilizando el programa Epi-Info versión 3. 4. 3; se comparó en ambos modelos celulares los resultados obtenidos con cada compuesto evaluado.

IV. RESULTADOS

4. 1. Evaluación de compuestos sobre el crecimiento de amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

En nuestra búsqueda de productos con actividad antileishmania, se evaluaron 8 compuestos y una droga de referencia usada actualmente en el tratamiento de la Leishmaniasis (Anfotericina B), sobre amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis*. A los 3 días de exposición, 5 de los compuestos evaluados mostraron tener actividad sobre el crecimiento de los parásitos; los compuestos más activos fueron: L. 106. 03, L. 106. 06, L. 406. 15, L. 606. 09 y L. 606. 10 con valores de IC50 de 4. 9 μM , 2. 7 μM , 4. 1 μM , 5. 3 μM y 6. 7 μM respectivamente (**Tabla I**). La droga de referencia, Anfotericina B, mostró ser muy activa sobre el crecimiento de los amastigotes axénicos, con un IC50 de 0. 08 μM .

4. 2. Citotoxicidad sobre macrófagos de peritoneales de ratón y la línea celular THP-1

Los ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón mostraron que los compuestos L. 606. 09 y L. 606. 10 presentaron una baja citotoxicidad, con valores de IC50 de 134. 5 μM y 139. 9 μM , respectivamente. Al evaluar la citotoxicidad sobre las células THP-1, el compuesto L. 606. 09 presentó un IC50 de 162 μM y el compuesto L. 606. 10 presentó un IC50 de 127. 29 μM . No se encontraron diferencias significativas ($p > 0. 05$) en la comparación de los resultados entre estos dos tipos de células (**Tabla II**).

En contraste, los compuestos L. 106. 03, L. 106. 06 y la droga de referencia Anfotericina B, presentaron un efecto citotóxico moderado sobre macrófagos peritoneales de ratón, con valores de IC50 de 13. 9 μM , 13. 5 μM y 5. 82 μM , respectivamente. Los mismos compuestos fueron relativamente menos citotóxicos sobre las células THP-1, con valores de IC50 de 32. 1 μM , 19. 8 μM y 7. 04 μM para L. 106. 03, L. 106. 06 y Anfotericina B, respectivamente ($p < 0. 05$).

Tabla I: Evaluación de Compuestos sobre el crecimiento amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis*

Estadio del Parásito	Parásito	IC 50 ± SD de:									
		Control (µM)	Compuestos (µM)								
		Anf B	L. 106. 03	L. 106. 04	L. 106. 05	L. 106. 06	L. 406. 15	L. 606. 09	L. 606. 10	SKE	
Amastigotes	L. ama	0.08 ± 0.01	4.9 ± 0.85	65.6 ± 9.77	37 ± 3.38	2.7 ± 0.	27	4.1 ± 0.20	5.3 ± 0.87	6.7 ± 0.51	19.7 ± 0.50

Resultados obtenidos al realizar los experimentos por triplicado L. ama= *Leishmania amazonensis*; Anf B=Anfotericina B.

Tabla II: Evaluación de la Citotoxicidad de los Compuestos sobre Macrófagos

Tipo de Macrófago	Extraído	CC 50 ± SD de:									
		Control (µM)			Compuestos (µM)						
		Anf B*	L. 106. 03*	L. 106. 04(ND)	L. 106. 05(ND)	L. 106. 06*	L. 406. 15(ND)	L. 606. 09**	L. 606. 10***	SKE**	
Macrófago de ratón	BALB/c	5.82 ± 0.42	13.9 ± 0.47	> 20	> 20	13.5 ± 0.29	> 20	134.5 ± 8.20	139.9 ± 2.22	1.2 ± 0.02	
	THP-1	P. L. A	7.04 ± 0.91	32.1 ± 1.90	20.4 ± 1.32	105.7 ± 11.40	19.8 ± 4.43	130.8 ± 5.87	162 ± 6.77	127.9 ± 8.68	2.9 ± 1.19

*p=0.0495; **p=0.275; ***p=0.512; ND=No determinado; resultados obtenidos de experimentos por triplicado; PLA=Pacientes con Leucemia Aguda Anf B=Anfotericina B.

Mann Whitney

4. 3. Cinética de Infección en macrófagos peritoneales de ratón y la línea celular THP-1

A. Macrófagos peritoneales de ratón

Los macrófagos peritoneales de ratón fueron infectados con parásitos de *L. peruviana* y *L. amazonensis* en estadio de amastigote axénico, utilizando una proporción de 2: 1 y 3: 1 parásitos por célula, respectivamente. El porcentaje de células infectadas con *L. peruviana* estuvo en el rango de 57% (0 horas p. i) a 81% (72 horas p. i) mientras con *L. amazonensis* estuvo entre 67% (0 horas p. i) y 79% (72 horas p. i) **Figura 3(a, b)**. El número promedio de amastigotes por macrófago en infecciones con *L. peruviana* estuvo entre 2. 02 (0 horas p. i) y 3. 01 (72 horas p. i), y en infecciones con *L. amazonensis* estuvo entre 1. 64 (0 horas p. i) y 2. 28 (72 horas).

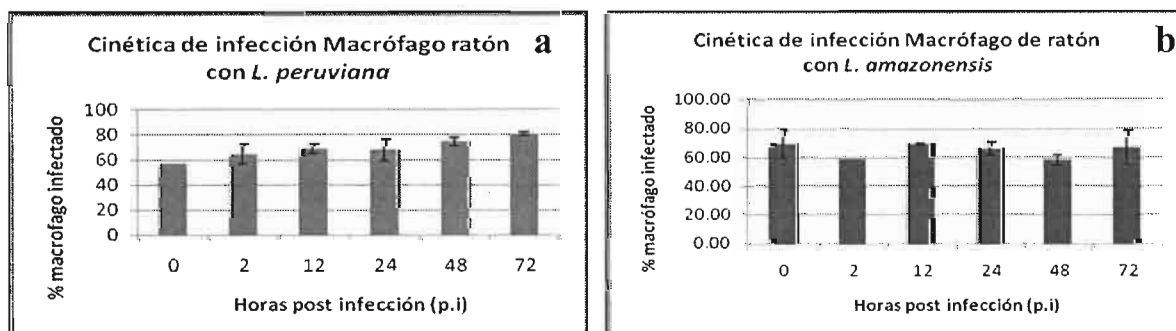


Figura 03: Media del porcentaje de macrófagos peritoneales de ratón infectados con amastigotes axénicos de *L. peruviana* y *L. amazonensis*.

La **figura 4 (a, b y c)** muestra la distribución de frecuencia del número de amastigotes por macrófago peritoneal de ratón infectado a las 2, 24 y 72 horas post infección (p. i). A las 2 horas p. i., *L. peruviana* y *L. amazonensis* no presentaron mayores diferencias en la frecuencia de amastigotes por macrófago infectado; las diferencias comenzaron a observarse a las 48 horas p. i., siendo más pronunciadas a las 72 horas p. i. En este tiempo (72 horas p. i.), la distribución de frecuencia de amastigotes por macrófago infectado en *L. peruviana* se desplazó hacia un mayor número de amastigotes (3-4 amastigotes por célula infectada), mientras que en *L. amazonensis* la frecuencia de amastigotes por macrófago infectado mostró un perfil similar al observado a las 2 y 24 horas p. i. Ello sugiere, que bajo las condiciones experimentales estudiadas, la especie *L. peruviana* presenta una mayor capacidad de adaptación y resistencia frente al mecanismo de defensa del macrófago en comparación con *L. amazonensis*”.

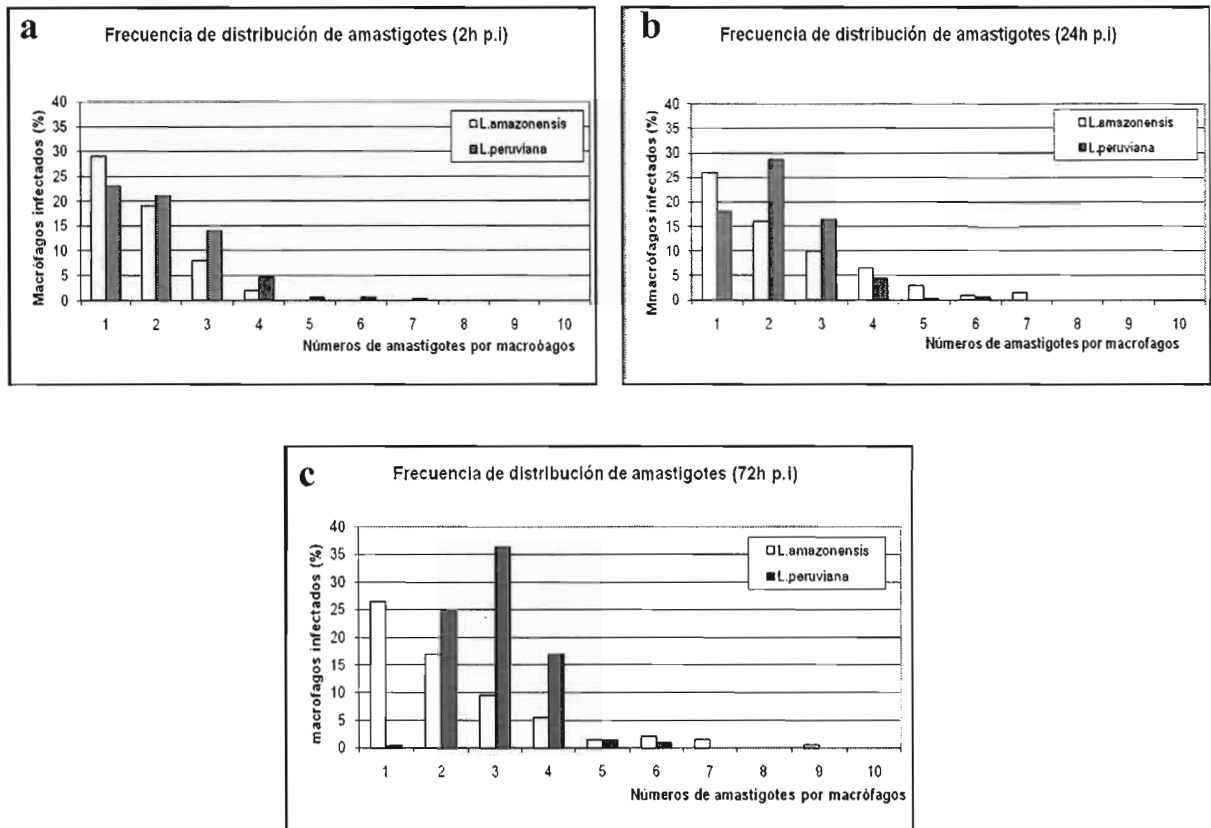


Figura 04. (a, b y c) Distribución de frecuencia de amastigotes por macrófagos peritoneales de ratón infectado a las 2, 24 y 72 horas post-infección entre *L. peruviana* (barras grises) y *L. amazonensis* (barras blancas)

B. Células THP-1

Las células THP-1 fueron infectadas con parásitos de *L. peruviana* y *L. amazonensis* en estadio de amastigote axénico en una proporción de 10: 1 y 30: 1 parásitos por célula, respectivamente. El porcentaje de células infectadas con *L. peruviana* varió entre 38. 6% (0 horas p. i) y 79. 5% (72 horas p. i) (**Figura 5**). La cepa *L. amazonensis* no fue infectiva cuando se utilizaron las células THP-1 (datos no mostrados). El número promedio de amastigotes por macrófago en infecciones con *L. peruviana* estuvo entre 1. 58 (0 horas p. i) y 3. 13 (72 horas p. i).

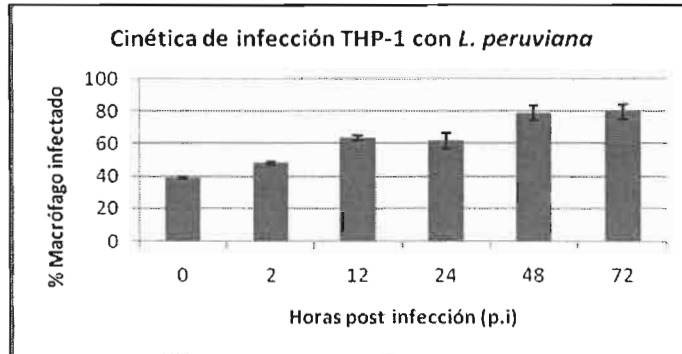


Figura 05: Media del porcentaje de células THP-1 infectadas con amastigotes axénicos de *L. peruviana*.

La figura 6(a) muestra la comparación de los porcentajes de infección entre los macrófagos peritoneales de ratón y la línea celular THP-1, infectada con *L. peruviana*. Las diferencias entre los porcentajes de infección no fueron estadísticamente significativas a las 48 y 72 horas p. i. ($p=0.15$ y $p=0.8$, respectivamente), pero sí lo fueron a las 0, 2, 12 y 24 horas p. i. ($p < 0.05$).

La figura 6(b) muestra la comparación del número de amastigotes por macrófago de ratón versus células THP-1 infectadas con *L. peruviana*. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en los puntos (horas post-infección) evaluados en ambos modelos.

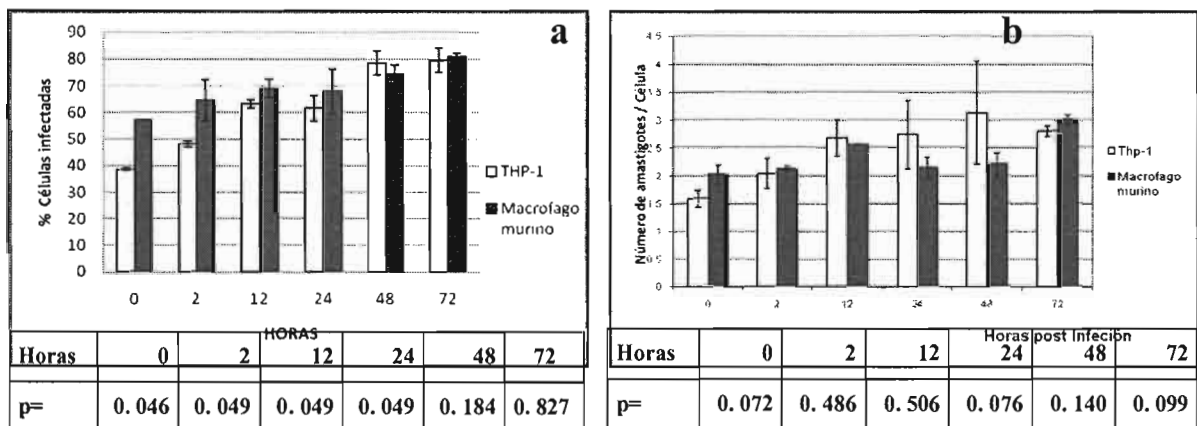


Figura 06. (a y b): Media del porcentaje de células infectadas y valores de "p" obtenidos en dos modelos de macrófagos (de ratón versus THP-1) infectados con amastigotes axénicos de la especie *L. peruviana* cepa LCA08.

4. 4. Evaluación de la actividad de los compuestos sobre macrófagos peritoneales de ratón y células THP-1 infectadas

4. 4. 1. Macrófagos peritoneales de ratón

Se comparó los porcentajes de reducción de la infección (%IR) en macrófagos peritoneales de ratón infectados con amastigotes axénicos y expuestos a los distintos compuestos evaluados. En el caso de los macrófagos infectados con *L. peruviana*, el compuesto L. 106. 06 presentó la mayor actividad (52% IR), seguido por los compuestos L. 606. 09 (45. 5%), L. 606. 10 (45%), L. 106. 05 (44. 3%) y L. 406. 15 (38. 3%); la droga de referencia Anfotericina B mostró un 73% de reducción (Tabla III). De los compuestos que fueron evaluados sobre macrófagos de ratón infectados con *L. amazonensis*, el compuesto con el %IR mas alto fue L. 406. 15 (71. 8%), seguido por los compuestos L. 106. 03 (47. 6%), y L. 606. 09 (36%); Anfotericina B mostró una reducción del 76. 9% (Tabla IV).

4. 4. 2. Células THP-1

Los compuestos fueron evaluados sobre células THP-1 infectadas con amastigotes axénicos de *L. peruviana*. La mayor actividad se observó con el compuesto L. 106. 03 (83. 5% IR), seguido por los compuestos L. 106. 06 (72. 5%), L. 406. 15 (66. 4%), L. 606. 10 (58. 4) y L. 606. 09 (47. 7%); Anfotericina B redujo la infección en un 83. 5% (Tabla V).

Tabla III: Porcentaje de reducción de la infección de macrófagos peritoneales de ratón infectados con amastigotes axénicos de *L. peruviana* (%IR) en presencia de los compuestos evaluados

Hospedero	Infectado con:	Macrófago Infectado (N. T)	%IR:								
			Control		Compuestos						
			Anf B [1µM]	L. 106. 03 [1µg/ml]	L. 106. 04 [10µg/ml]	L. 106. 05 [10µg/ml]	L. 106. 06 [1µg/ml]	L. 406. 15 [1µg/ml]	L. 606. 09 [10µg/ml]	L. 606. 10 [10µg/ml]	SKE [0. 01µg/ml]
Macrófago De ratón	Amas <i>L. per</i>	0	73. 3	4. 6	29	44. 3	52	38. 3	45. 5	45	34. 3

Los resultados de %IR están calculados en relación a la concentración más activa.

Resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado; Amas= amastigotes; L. per= *Leishmania peruviana*; Anf B= Anfotericina B. N. T= No tratado

Tabla IV: Porcentaje de reducción de la infección en macrófagos peritoneales de ratón infectados con amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (%IR) en presencia de los compuestos evaluados

Hospedero	Infectado con:	Control Macrófago Infectado	%IR:								
			Control Anf B [1µM]	Compuestos							
			L. 106. 03 [5µg/ml]	L. 106. 04 [10µg/ml]	L. 106. 05 [10µg/ml]	L. 106. 06 [10µg/ml]	L. 406. 15 [10µg/ml]	L. 606. 09 [10µg/ml]	L. 606. 10 [10µg/ml]	SKE [0. 01µg/ml]	
Macrófago De ratón	Amas <i>L. ama</i>	0	76.9	47.6	12.5	0	24.4	71.8	36	17.3	34.3

Resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado; **Amas**= amastigotes; **L. ama**= *Leishmania amazonensis*; **Anf B**= Anfotericina B.

Tabla V: Porcentaje de reducción de la infección en células THP-1 infectadas con amastigotes axénicos de *L. peruviana* (%IR) en presencia de los compuestos evaluados

Hospedero	Infectado con:	Control Macrófago Infectado	%IR:								
			Anf B [1µM]	Compuestos							
			L. 106. 03 [10µg/ml]	L. 106. 04 [10µg/ml]	L. 106. 05 [10µg/ml]	L. 106. 06 [10µg/ml]	L. 406. 15 [10µg/ml]	L. 606. 09 [10µg/ml]	L. 606. 10 [10µg/ml]	SKE [1µg/ml]	
Células THP-1	amas <i>L. per</i>	0	89.9	83.5	39.7	24.1	72.5	66.4	47.7	58.4	21.9

Resultados obtenidos de experimentos realizados por triplicado; **Amas**= amastigotes; **L. per**= *Leishmania peruviana*; **Anf B**= Anfotericina B.

En la **tabla VI** se observa el IC50 de todos los compuestos evaluados en ambos modelos celulares (macrófagos de ratón y células THP-1), infectadas con amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y *L. peruviana*. Los compuestos con mayor actividad sobre macrófagos peritoneales de ratón infectados con *L. peruviana* fueron L. 106. 06 y L. 406. 15 con valores de IC50 de 3. 7 μ M y 2. 9 μ M, respectivamente; la droga de referencia Anfotericina B tuvo un valor de IC50 de 0. 4 μ M. En el caso de macrófagos peritoneales de ratón infectados con *L. amazonensis*, los compuestos con mayor actividad fueron L. 106. 03 (IC50=13. 1 μ M) y L. 406. 15 (17. 7 μ M), además de Anfotericina B (0. 63 μ M). Por otro lado, se realizaron los mismos ensayos sobre células THP-1 infectadas con *L. peruviana*; los compuestos con mayor actividad fueron L. 106. 03 (IC50=13. 6 μ M), L. 106. 06 (16. 2 μ M) y L. 406. 15 (15. 2 μ M); Anfotericina B (0. 1 μ M). Las diferencias en los valores de IC50 para los compuestos L. 106. 03, L. 106. 04, L. 106. 05 y L. 606. 09 no fueron estadísticamente significativas entre los dos modelos celulares infectados con *L. peruviana*.

Tabla VI: Evaluación de Compuestos sobre macrófagos infectados con amastigotes axénicos de *Leishmania* spp.

Tipo de	Especie	control	IC 50 \pm SD de:							
			Compuestos							
Macrófago	Parásito	Anf B (μ M)	L. 106. 03*** (μ M)	L. 106. 04** (μ M)	L. 106. 05*** (μ M)	L. 106. 06* (μ M)	L. 406. 15* (μ M)	L. 606. 09*** (μ M)	L. 606. 10* (μ M)	SKE (μ M)
Macrófago	<i>L. per</i>	0. 4 \pm 0. 20	15. 08 \pm 0. 44	33. 3 \pm 3. 61	26. 0 \pm 3. 61	3. 7	2. 9 \pm 0. 18	30. 3 \pm 2. 10	32. 2 \pm 3. 65	2. 9
De ratón	<i>L. ama</i>	0. 63 \pm 0. 15	13. 1 \pm 1. 36	>23. 5	>23. 2	>24. 1	17. 7 \pm 2. 76	43. 7 \pm 2. 11	42. 9 \pm 8. 22	0. 3 \pm 0. 02
Células THP-1	<i>L. per</i>	0. 1	13. 6 \pm 2. 40	29 \pm 2. 62	38. 5	16. 2 \pm 4. 49	15. 2 \pm 3. 21	28. 6 \pm 3. 57	20. 8 \pm 1. 06	4. 2

Valores de *p* calculados entre macrófagos peritoneales de ratón y células THP-1 infectados con *L. peruviana* **p*= 0. 0495; ***p*= 0. 5; ****p*= 0. 8; resultados obtenidos en experimentos realizados por triplicado; **L. per**=*Leishmania peruviana*; **L. ama**=*Leishmania amazonensis*; **Anf B**=Anfotericina B.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se buscó validar el uso de la línea celular THP-1 como modelo celular de infección in vitro con el parásito *Leishmania*, a fin de realizar evaluaciones de compuestos con presunta actividad antileishmania. Este modelo fue comparado con el modelo de macrófagos peritoneales de ratón para dos especies del parásito, *L. amazonensis* y *L. peruviana*.

La primera etapa de la investigación consistió en la evaluación de los compuestos sobre los parásitos en estadio de amastigote axénico. Se ha demostrado que los cultivos de amastigotes axénicos, a diferencia de los promastigotes, se asemejan a nivel morfológico, ultra-estructural, bioquímico y molecular al estadio del amastigote intracelular que se encuentra en la forma clínica [Eperon & McMahon-Pratt, 1989 - a, b; Teixeira, *et al.*, 2002- a, b]. Es de principal importancia la capacidad de dar información sobre la actividad de los compuestos en el estadio relevante del parásito [Sereno & Lemesre, 1997-a]. Los amastigotes axénicos son fáciles de manipular y la cuantificación de la actividad de la droga es simple.

Los resultados de la **Tabla I** muestran la actividad antileishmania de 8 compuestos. La droga de referencia anfotericina B presentó una alta actividad sobre el crecimiento de los amastigotes axénicos de *L. amazonensis* con un valor de IC₅₀ de 0.08 µM; este resultado contrasta con los resultados obtenidos por [Sereno & Lemesre, 1997-b] sobre amastigotes axénicos de *L. infantum* (IC₅₀=0.79 µM), *L. amazonensis* (0.26 µM) y *L. mexicana* (0.21 µM).

Los 7 compuestos evaluados, excepto SkE, pertenecen a la familia química de las Quinoxalinas; estos compuestos mostraron una actividad contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, que pertenece a la misma familia del patógeno *Leishmania* (Aguirre *et al.* 2004); en ese estudio se demostró que las quinoxalinas tienen una actividad de IC₅₀= 4.5 µM, semejante a la droga de referencia Nifurtimox (7.7 µM). En nuestro estudio encontramos una actividad de IC₅₀ de 2.7 µM para L. 106.06, 4.1 µM para L. 406.15, 4.9 µM para L. 106.03, 5.3 µM para L. 606.09 y 6.7 µM para L. 606.10, al ser evaluados sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (**Tabla I**). Las actividades encontradas de estos compuestos son similares a las encontradas contra *T. cruzi* (Aguirre *et al.* 2004).

De otro lado, [Marín, *et al.*, 2008], demostraron que compuestos con una estructura muy similar a los evaluados en este estudio tienen una actividad de IC₅₀ inferior a 2 µM contra *Plasmodium falciparum*. También se pudo observar que estos compuestos tienen actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rb [Zarranz, *et al.*, 2003], *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Micoplasma hominis*, y algunas bacterias gram-positivas y gram-negativas como: *Escherichia coli* ATTC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 2913 y *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Carta A 2004). Estos hallazgos demuestran que la familia de las quinoxalinas tiene una amplia actividad contra varios patógenos.

Los estudios de [Mehta, *et al.*, 1984], encontraron que dosis superiores a 5 µM de anfotericina B sobre macrófagos peritoneales de ratón pueden alterar la morfología más no la membrana del macrófago; sin embargo, cuando se aumenta la concentración a 10 µM se observa un daño considerable del macrófago. En nuestro estudio encontramos un IC₅₀ = 5.82 µM sobre macrófagos peritoneales de ratón (**tabla II**). Por otro lado, se ha reportado que concentraciones mayores a 5 µM de anfotericina B también pueden afectar la viabilidad de líneas celulares del tipo THP-1 [Rogers, *et al.*, 2003; Sau, *et al.*, 2003]. Sin embargo, nuestro estudio demostró que concentraciones de anfotericina superiores a 5 µM sobre THP-1 no afectaron la viabilidad del macrófago (**Tabla II**). Se ha reportado un efecto citotóxico de quinoxalinas sobre líneas tumorales humanas del tipo B79, HT29, TK-10 y CACO-12 (Amaia, Pachon *et al.* 2005), pero se desconoce si esto también ocurre sobre macrófagos peritoneales de ratón o líneas celulares del tipo THP-1. En este contexto, nuestro estudio es el primer reporte que permitiría abarcar un nuevo campo de estudio para evaluar la actividad tanto en el modelo de infección *in vitro* con *Leishmania spp.* o cualquier otro patógeno de interés.

Al realizar los experimentos de infección *in vitro* con ambas especies de *Leishmania* (*L. amazonensis* y *L. peruviana*) en ambos modelos celulares (macrófago de ratón *versus* THP-1) se decidió trabajar con concentraciones inferiores a 1 µM de anfotericina B, ya que a esta concentración no se observó cambios morfológicos en los macrófagos ni se vio alterada su capacidad adherente.

La concentración inhibitoria media (IC50) de anfotericina B en macrófagos peritoneales de ratón infectados con *L. peruviana* y *L. amazonensis* mostró valores de 0.4 y 0.6 μM , respectivamente. Estos resultados son consistentes con los reportados por [Buckner, *et al.*, 2005] con IC50 de 0.11 μM con anfotericina B sobre macrófagos peritoneales de ratón infectados con *L. amazonensis* y con lo descrito por [Castillo, *et al.*, 2007] con IC50 de 1 μM con anfotericina B en macrófagos peritoneales de ratón infectados con *L. amazonensis*.

El estudio de la cinética y el uso de las diferentes proporciones de parásitos por células al momento de realizar las infecciones, sirvió para determinar el porcentaje de infección a diversas horas (24, 48 y 72) que abarcaron las etapas de inicio y término del ensayo, lo cual es importante al momento de agregar los compuestos a evaluar, ya que nos da una idea de que la actividad de los compuestos, se debe a la interacción con los parásitos y no a un efecto del tiempo. De acuerdo con (Yardley, *et al.*, 2006) que utilizaron varias especies de *Leishmania* en una proporción de 7 parásitos por macrófagos al realizar sus infecciones, posteriormente, 24 horas p. i. ellos evaluaron el porcentaje de infección para determinar los niveles iniciales de infección y si este nivel estaba alrededor del 80% las células infectadas podrían ser expuestas a las drogas para su evaluación.

El estudio de la línea celular THP-1 infectada con *L. peruviana* mostró que a la concentración de 1 μM de Anfotericina B se redujo la infección (%IR) en un 89.9% (Tabla V), resultado similar al encontrado con el modelo de macrófago de ratón (73.3%) (Tabla III). La actividad de Anfotericina B contra *L. peruviana* en la línea celular THP-1; fue de 0.1 μM ., siendo esto el primer reporte sobre la actividad de Anfotericina B sobre esta línea celular infectada con *L. peruviana*; esta droga de referencia mostró también ser muy activa en otros modelos celulares utilizando otras cepas de *Leishmania*; en estudios realizados [Callahan, *et al.*, 1997], sobre líneas celulares de tipo J774 infectadas con *L. mexicana* obtuvo un IC50 de 0.24 μM . Sin embargo, vale mencionar que en este estudio de investigación se encontraron compuestos con buena actividad antileishmania, pero ninguno de ellos mostró igualar ó superar la actividad de la droga de referencia Anfotericina B que se mostraron en los resultados que descritos anteriormente.

Los estudios de [Atkinson, *et al.*, 1978], demostraron que pacientes tratados con una dosis de 70 mg de Anfotericina B por día, tienen una concentración alrededor de 1 μM en el plasma

sanguíneo. Esto demuestra que valores de IC50 cercanos a este valor pueden tener una acción directa contra parásitos de *Leishmania* spp. intracelulares, resultando en la eliminación y finalmente la curación del paciente.

Estos datos descritos anteriormente, sugieren que el uso de la línea celular (THP-1) permite evaluar y establecer los patrones de capacidad de infección de *L. peruviana* en condiciones in vitro frente a compuestos nuevos con potencial actividad antileishmania.

VI. CONCLUSIONES

- Se validó el uso de la línea celular THP-1, en la evaluación de los compuestos naturales y de síntesis obteniéndose que los productos más activos sobre las especies de *Leishmania* fueron los compuestos de la familia de las quinoxalinas: L. 106. 03, L. 106. 06, L. 406. 15, L. 606. 09 y L. 606. 10.
- Al comparar las células THP-1 y los macrófagos peritoneales de ratón, se obtuvo un porcentaje de infección similar en ambos modelos utilizando la cepa LCA 08 (*Leishmania peruviana*), por lo que se concluye que esta cepa tiene una mayor capacidad de duplicación que la cepa L ma CL 1 (*L. amazonensis*) en el estadio de amastigote intracelular, lo que sugiere una mejor capacidad de evasión de los mecanismos de defensa de los macrófagos.
- Se determinó que los compuestos más activos sobre macrófagos peritoneales de ratón infectados fueron los compuestos L. 106. 06; L. 606. 09; L. 606. 10 y los más activos sobre células THP-1 infectadas fueron L. 106. 03; L. 106. 06; L. 606. 09; L. 606. 10; anfotericina B mostró tener una buena actividad antileishmania por lo que está considerado como una droga de segunda línea en el tratamiento de la leishmaniasis. Los compuestos evaluados mostraron ser buenos candidatos como posibles compuestos antileishmania pero no llegaron a igualar o superar a la droga de referencia.
- El compuesto simalikalactona E (SkE) mostró ser altamente citotóxico en ambos modelos celulares a demás de presentar baja actividad contra el crecimiento de los amastigotes axénicos, por lo tanto no se recomienda como compuesto antileishmania.
- Los compuestos de la familia de las quinoxalinas como los compuestos L. 606. 09 y L. 606. 10 demostraron tener una buena actividad contra los amastigotes de *Leishmania* y además de no ser citotóxico contra las macrófagos peritoneales de ratón y células THP-1.
- La línea celular THP-1 utilizada en el desarrollo de un modelo de infección in vitro con la cepa LCA 08, facilitará los estudios de nuevos compuestos con potencial actividad antileishmania, dejando la puerta abierta para ensayar nuevas infecciones con otras especies de *Leishmania*.

VII. RECOMENDACIONES

En el presente trabajo de tesis y para posteriores estudios de este tipo se recomienda:

- Debido a algunos problemas que se tuvieron en los cultivos con algunas cepas de *Leishmania*, diferenciación e infección, se sugiere evaluar un número más amplio de cepas de leishmania de diferentes especies.
- El uso de Anfotericina B como compuesto de referencia, droga utilizada en el tratamiento de leishmania, mostró tener buenos resultados disminuyendo la infección en ambas células hospederas, mostrando reproducibilidad en los resultados, siendo bueno para utilizarlo como control positivo en los ensayos.
- El uso de compuestos del tipo quinoxalinas mostró tener actividad contra los amastigotes axénicos y macrófagos infectados en ambas células hospederas, por lo tanto, se sugiere continuar con los estudios con este tipo de compuestos en busca de nuevas alternativas terapéuticas de tratamiento contra la leishmaniasis a nivel in vitro, y continuar con los ensayos a nivel in vivo (modelo de infección en ratones o hámster susceptibles al patógeno).

VIII. RESUMEN

La leishmaniasis son un complejo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, el cual, se caracteriza por ser organismos dimórficos que presentan dos estadios denominados “**promastigote**” y “**amastigote**”, que presentan tres formas clínicas: visceral (VL), cutánea (CL) y leishmaniasis mucocutánea (MCL), las cuales presentan distinta inmunopatología. En el Perú, el área endémica alcanza el 74% del territorio nacional afectando a 12 departamentos y es la segunda epidemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis.

En el presente trabajo, se buscó establecer y/o estandarizar un tipo de macrófago para ser usado como modelo *in vitro* en estudios quimioterapéuticos antileishmania, con el propósito de minimizar el uso de animales de laboratorio. Este modelo fue comparado con el modelo de macrófagos peritoneales de ratón para dos especies del parásito, *L. amazonensis* y *L. peruviana*.

Se evaluó la actividad antileishmania de 8 compuestos (**Tabla I**). La droga de referencia presentó una alta actividad sobre los amastigotes axénicos de *L. amazonensis* con un valor de IC₅₀ de 0.08 µM, las quinoxalinas mostraron una actividad de IC₅₀ de 2.7 µM para L. 106.06, 4.1 µM para L. 406.15, 4.9 µM para L. 106.03, 5.3 µM para L. 606.09 y 6.7 µM para L. 606.10.

Los resultados de citotoxicidad muestran para anfotericina B un IC₅₀ = 5.82 µM sobre macrófagos peritoneales de ratón (tabla II). Por otro lado, se ha reportado que concentraciones mayores a 5 µM de anfotericina B también pueden afectar la viabilidad de líneas celulares del tipo THP-1, sin embargo, nuestro estudio demostró que concentraciones de anfotericina superiores a 5 µM sobre THP-1 no afectaron la viabilidad del macrófago.

Al realizar los experimentos de infección *in vitro* con *Leishmania* spp. para ambos modelos celulares (de ratón *versus* THP-1) se decidió trabajar con concentraciones inferiores a 1 µM de anfotericina B, ya que a esta concentración no se observó cambios morfológicos en los macrófagos ni se vio alterada su capacidad adherente. La concentración inhibitoria media (IC₅₀)

de anfotericina B en macrófagos peritoneales de ratón infectados con *L. peruviana* y *L. amazonensis* mostró valores de 0. 4 y 0. 6 μM , respectivamente.

El estudio de la línea celular THP-1 infectada con *L. peruviana* mostró que a la concentración de 1 μM de Anfotericina B se redujo la infección (%IR) en un 89. 9%, resultado similar al encontrado con el modelo de macrófago de ratón (73. 3%). La actividad de Anfotericina B contra *L. peruviana* en la línea celular THP-1; fue de 0. 1 μM , siendo este el primer reporte sobre la actividad de Anfotericina B sobre esta línea celular infectada con *L. peruviana*. Sin embargo, vale mencionar que en este estudio de investigación se encontraron compuestos con buena actividad antileishmania, pero ninguno de ellos mostró igualar ó superar la actividad de la droga de referencia Anfotericina B.

Al comparar los valores de IC50 entre ambos modelos celulares infectados con *L. peruviana* se encontró que solo 3 de los 8 compuestos evaluados tuvieron diferencias estadísticamente significativas (compuestos L106. 06, L406. 15 y L. 606. 10), Nosotros observamos que los compuestos L. 106. 06 y L. 406. 15 fueron más activos, mientras que el compuesto con menor actividad fue L. 606. 10. Se observó una correspondencia en la actividad de los compuestos contra *L. peruviana* en ambos modelos celulares.

Esto sugiere que el uso de líneas celulares (THP-1) permite evaluar y establecer los patrones de capacidad de infección in vitro frente a compuestos nuevos con potencial actividad antileishmania.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre G, Cerecetto H, Di Maio R, *et al.* Quinoxaline N, N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 3835-9
- Amaia A, Pachon G, Cascante M, Creppy EE, Monge A and Lopez de Certain A. Selective toxicity of a quinoxalinas 1, 4-di-N-oxide derivative in human tumour cell lines. *Arzneimittelforschung* 2005; 55: 177-82
- Atkinson AJ, Jr ., Bennett JE. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 271-6
- Barassi N, Benavides F and Ceccarelli A. [Ethics in the use of experimental animals]. *Medicina (B Aires)* 1996; 56: 531-2
- Barker DC, Butcher J. The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 285-97
- Benaim, G ., Serrano, X. M ., Rojas, H ., Bolaños, P. Experiencia práctica: Evaluación del efecto de la Amiodarona sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana*, mediante el uso de la tecnología de microscopia confocal. Instituto de Biología Experimental. <http://asmcourse.ivic.ve/papers/ivic/benaim.pdf>.
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV and Titus RG. Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun* 2007; 75: 2359-65
- Buckner FS, Wilson AJ. Colorimetric assay for screening compounds against Leishmania amastigotes grown in macrophages. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 600-5
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R and Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 818-22
- Castillo D, Arevalo J, Herrera F, *et al.* Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmania activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 410-4

- Chan-Bacab MJ, Pena-Rodriguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep* 2001; 18: 674-88
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19: 502-8
- Dasgupta B, Roychoudhury K, Ganguly S, Akbar MA, Das P and Roy S. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. *Scand J Immunol* 2003; 57: 366-74
- Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Sharp SJ, *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 302-10
- Davis AJ, Kedzierski L. Recent advances in antileishmania drug development. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 163-9
- Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, *et al.* Antileishmania activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1349-54
- Di Giorgio C, Ridoux O, Delmas F, Azas N, Gasquet M and Timon-David P. Flow cytometric detection of *Leishmania* parasites in human monocyte-derived macrophages: application to antileishmania-drug testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3074-8
- Eperon S, McMahon-Pratt D. Extracellular amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. II. Stage- and species-specific monoclonal antibodies. *J Protozool* 1989; 36: 510-8. (b)
- Eperon S, McMahon-Pratt D. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. *J Protozool* 1989; 36: 502-10. (a)
- Farah F, Klaus N, Frankenburg S, Klión A, Nutman T. Infecciones por Protozoarios y Helminthos. En Fitzpatrick T. *Dermatología en Medicina General*. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid 1997 pp: 2882-88
- Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL and Frommel D. An in vitro model for screening antileishmania drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop* 1992; 51: 237-45

- Grevelink G, Lerner G. Leishmaniasis. JAAD 1996; 34 (2): 257, 271.
- Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 230-50
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. Harrison's Principles of Internal Medicine 14th Edition. McGraw-Hill. 1998, 217: 1-7
- INS. Leishmaniasis, Módulos Técnicos series de Documentos Monográficos. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Lima. 2000
- Ismaeel AY, Garmson JC, Molyneux DH and Bates PA. Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* in vitro and in *Lutzomyia longipalpis*. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 421-5
- Lainson R, Ready PD and Shaw JJ. Leishmania in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1979; 206: 307-18. (a)
- Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA and Draper CC. Chagas's Disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Para, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979; 73: 193-204. (b)
- Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD and Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Para State. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979; 73: 239-42. (c)
- Lemesre, J. L. "Method for the culture in vitro of different stages of tissue parasites". Brevet d'invention international, 1994. PCT/FR No 94/00577
- Lucas C, Franke A, Cachay M, Tejada A, Cruz M, Kreutzer R, Barker D, McCann S, Watts D. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998; 59: 312 – 17.
- Maia C, Rolao N, Nunes M, Goncalves L and Campino L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. Acta Trop 2007; 103: 150-5

- Marin A, Moreira Lima L, Solano B, *et al.* Antiplasmodial structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1, 4-di-N-oxide derivatives. *Exp Parasitol* 2008; 118: 25-31
- Mehta R, Lopez-Berestein G, Hopfer R, Mills K and Juliano RL. Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 770: 230-4
- Mendoza-Leon A, Luis L, Fernandes O, Cupolillo E and Garcia L. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *viannia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1: S65-70
- Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, *et al.* Antileishmania and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 783-7
- Miles MA. Biochemical identification of the leishmanias. *Bull Pan Am Health Organ* 1985; 19: 343-53
- Monzote Fidalgo L, Montalvo Alvarez AM, Geigel LF, Perez Pineiro R, Suarez Navarro M and Rodriguez Cabrera H. Effect of thiadiazine derivatives on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 329-30
- Moretti C, Debitus C, Fournet A, Sauvain M, Bourdy G and Laurent D. [Tropical biological diversity and therapeutic innovations. Research conducted by ORSTOM]. *Ann Soc Belg Med Trop* 1993; 73: 169-78
- Ogunkolade BW, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita JP and Frommel D. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta Trop* 1990; 47: 171-6
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C and Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 2007; 56: 45-50
- Rogers PD, Barker KS, Herring V and Jacob M. Heat-induced superaggregation of amphotericin B attenuates its ability to induce cytokine and chemokine production in the human monocytic cell line THP-1. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 405-8
- Sanchez, L ., Saenz, Eliana ., Pancorbo, Julia ., Zegarra, R ., Garces, N ., Regis, A. Leishmaniasis. *Dermatol. Perú* 2004; 14: 2: 82-98.

- Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT and Levitz SM. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278: 37561-8
- Schreiber W. *Leishmaniasis: Infectious diseases in the history of Medicine*. Editions Roche, Basel, Switzerland. 1987
- Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F and Ouaisi A. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007; 56: 3-7
- Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmania agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 972-6. (b)
- Sereno D, Lemesre JL. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Res* 1997; 83: 401-3. (a)
- Teixeira MC, de Jesus Santos R, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L and dos-Santos WL. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res* 2002; 88: 963-8. (a)
- Teixeira MM, Gazzinelli RT and Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 2002; 18: 262-5. (b)
- WHO. 1993. The Leishmaniasis CTD/MIP/wp. 93. 8. WHO/HQ. Geneva.
- WHO/TDR. 2004. *Nature Reviews Microbiology* 2: 692-693.
- Worley JR, Baugh MD, Hughes DA, *et al.* Metalloproteinase expression in PMA-stimulated THP-1 cells. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR gamma) agonists and 9-cis-retinoic acid. *J Biol Chem* 2003; 278: 51340-6
- www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm
- Zarranz B, Jaso A, Aldana I and Monge A. Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1, 4-di-N-oxide derivatives. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 2149-56

ANEXOS

I. FOTOS



Foto 01: Manifestaciones clínicas de lesiones producidas por *Leishmania*. (A) Leishmaniasis cutánea y (B) Leishmaniasis mucocutánea

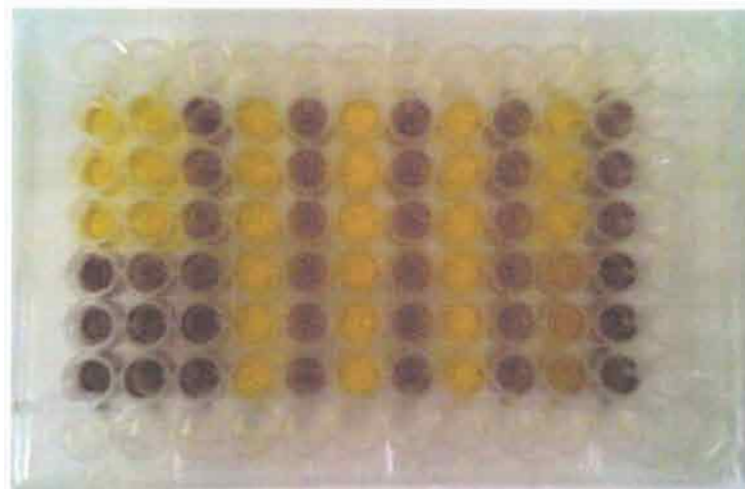


Foto 02: Reacción con MTT

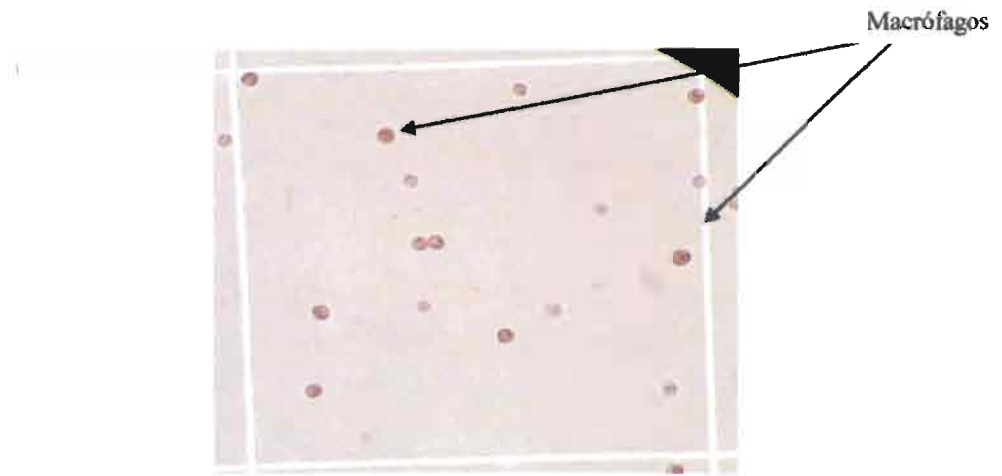


Foto 03: Cuantificación de macrófagos peritoneales de ratón con reactivo rojo neutral

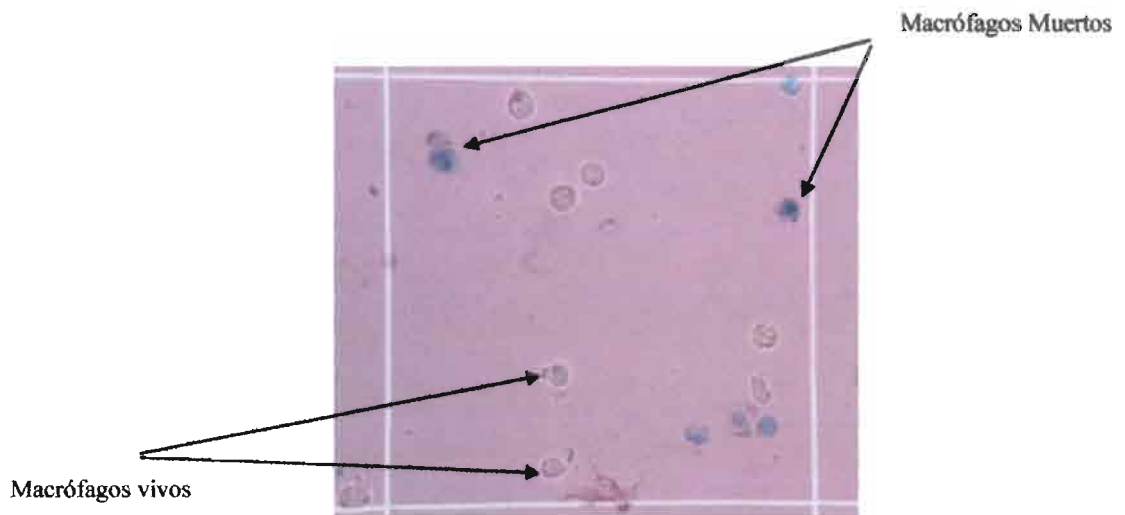


Foto 04: Cuantificación de células THP-1 con reactivo azul de tripan

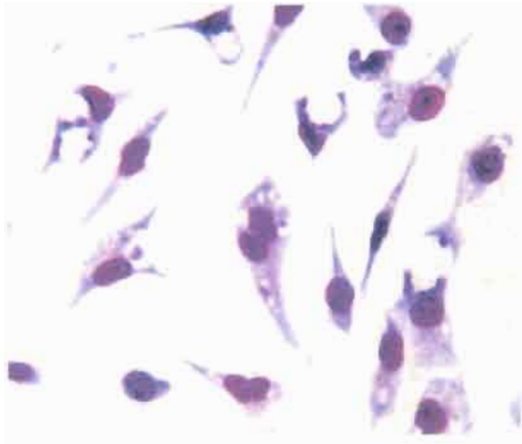


Foto 05: Macrófago de ratón infectado con *Leishmania amazonensis*

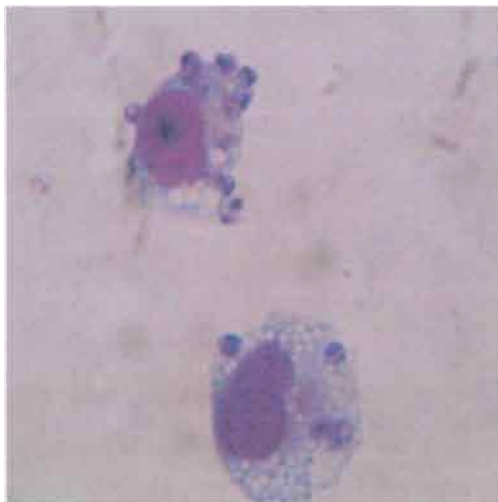


Foto 06: Línea celular THP-1 infectado con *Leishmania amazonensis*



Foto 07: Lesiones producidas por parásitos de *Leishmania amazonensis* en patas de ratones Balb/c

II. Cuadro de Rango de los Compuestos

A. Citotoxicidad: Macrófago de ratón

	Macrófago ratón	DMSO 1%	DMSO 0.1%	ANF 10µM	ANF 1µM	L106.03 100µg/ml	L106.03 10µg/ml	L106.03 1µg/ml	L106.03 0.1µg/ml	L106.04 100µg/ml	L106.04 10µg/ml	L106.04 1µg/ml	L106.04 0.1µg/ml	L106.05 100µg/ml	L106.05 10µg/ml	L106.05 1µg/ml	L106.05 0.1µg/ml
VIVOS	63	60	70	3	73	0	0	88	100	63	87	100	100	0	67	100	100
	43	45	65	2	78	0	0	93	100	57	61	100	100	0	59	100	100
	64	63	63	2	83	0	0	117	100	61	72	100	100	0	53	100	100
promedio	56.67	56	66.00	2.33	78.00	0.00	0.00	99.33	100.00	60.33	73.33	100.00	100.00	0.00	59.67	100.00	100.00
MUERTOS	3	3	1	83	2	100	82	3	0	25	1	0	0	100	17	0	0
	1	3	0	59	3	100	83	1	0	23	3	0	0	100	16	0	0
	0	6	2	51	4	100	29	7	0	20	1	0	0	100	12	0	0
promedio	1.33	4.00	1.00	64.33	3.00	100.00	64.67	3.67	0.00	22.67	1.67	0.00	0.00	100.00	15.00	0.00	0.00
% VIVOS	97.70	96.55	113.79	4.02	134.48	0.00	0.00	171.26	172.41	104.02	126.44	172.41	172.41	0.00	102.87	172.41	172.41
% muertos	2.30	3.45	-13.79	95.98	-34.48	100.00	100.00	-71.26	-72.41	-4.02	-26.44	-72.41	-72.41	100.00	-2.87	-72.41	-72.41

L106.06 100µg/ml	L106.06 10µg/ml	L106.06 1µg/ml	L106.06 0.1µg/ml	L406.15 100µg/ml	L406.15 10µg/ml	L406.15 1µg/ml	L406.15 0.1µg/ml	L609.09 100µg/ml	L609.09 10µg/ml	L609.09 1µg/ml	L609.09 0.1µg/ml	L609.10 100µg/ml	L609.10 10µg/ml	L609.10 1µg/ml	L609.10 0.1µg/ml	SKE 10µg/ml	SKE 1µg/ml
0	0	47	100	0	73	77	100	0	53	66	100	0	62	100	100	0	72
0	0	61	100	0	41	99	100	0	47	83	100	0	81	100	100	0	61
0	0	83	100	0	33	63	100	0	29	73	100	0	57	100	100	0	75
0.00	0.00	63.67	100.00	0.00	49.00	79.67	100.00	0.00	43.00	74.00	100.00	0.00	66.67	100.00	100.00	0.00	69.33
100	31	6	0	53	17	20	0	40	5	10	0	49	8	0	0	100	4
100	33	2	0	43	12	3	0	53	16	9	0	49	5	0	0	100	3
100	52	3	0	39	16	3	0	29	18	2	0	53	12	0	0	100	1
100.00	38.67	3.67	0.00	45.00	15.00	8.67	0.00	40.67	13.00	7.00	0.00	50.33	8.33	0.00	0.00	100.00	2.67
0.00	0.00	109.77	172.41	0.00	84.48	137.36	172.41	0.00	74.14	127.59	172.41	0.00	114.94	172.41	172.41	0.00	82.87
100.00	100.00	-9.77	-72.41	100.00	15.52	-37.36	-72.41	100.00	25.86	-27.59	-72.41	100.00	-14.94	-72.41	-72.41	100.00	17.13

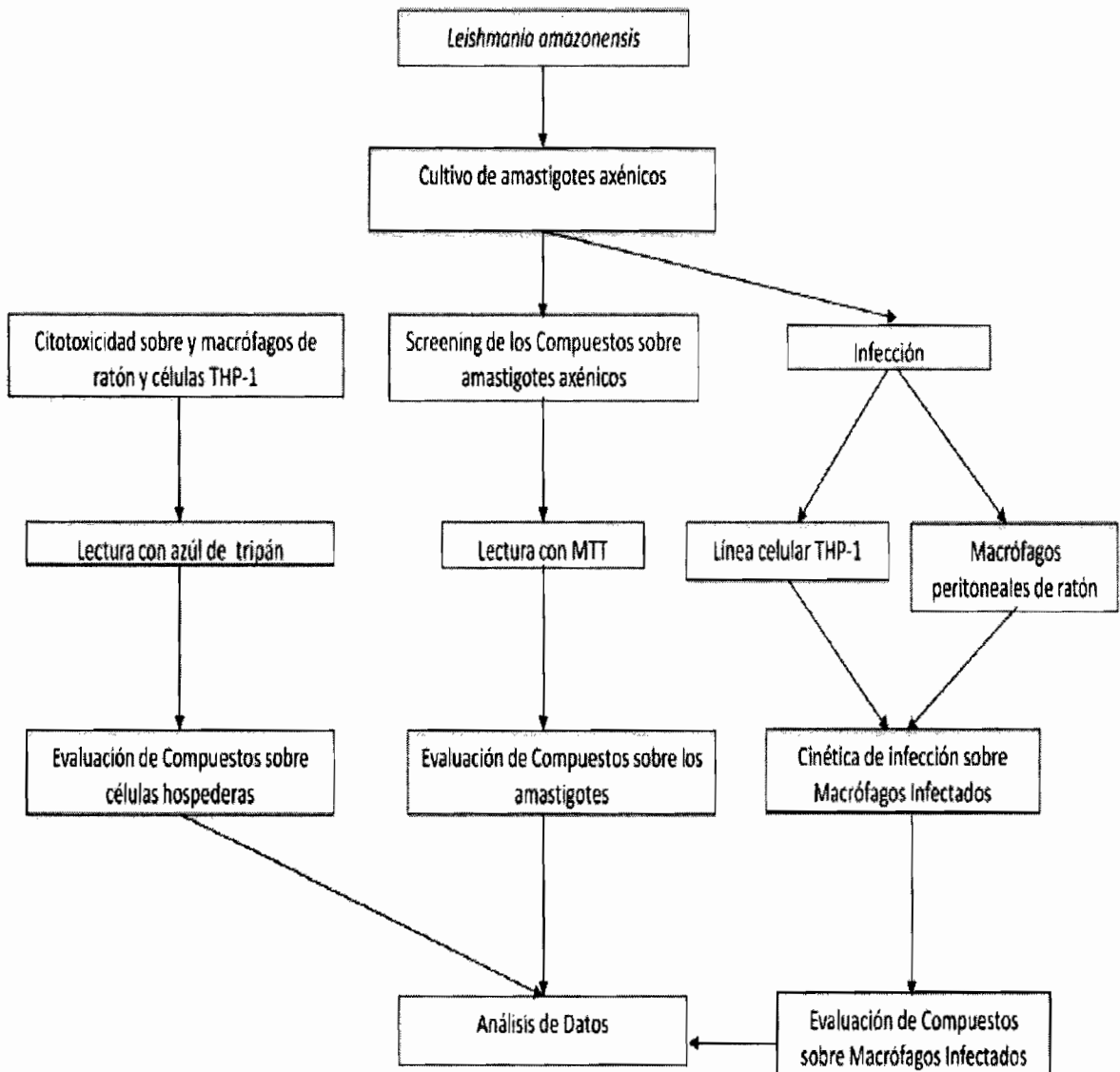
B. Citotoxicidad: Línea celular THP-1

	THP-1	DMSO 1%	DMSO 0.1%	ANF 10µM	ANF 1µM	L106.03 100µg/ml	L106.03 10µg/ml	L106.03 1µg/ml	L106.03 0.1µg/ml	L106.04 100µg/ml	L106.04 10µg/ml	L106.04 1µg/ml	L106.04 0.1µg/ml	L106.05 100µg/ml	L106.05 10µg/ml	L106.05 1µg/ml	L106.05 0.1µg/ml
VIVOS	89	87	90	49	82	4	63	83	100	0	40	79	100	0	62	72	100
	79	78	82	44	113	6	57	93	100	0	39	92	100	0	49	81	100
	67	82	80	36	93	8	49	89	100	0	41	91	100	0	41	91	100
promedio	78.33	82.33	84.00	43.00	96.00	5.00	56.33	88.33	100	0.00	40.00	87.33	100	0.00	50.67	81.33	100
MUERTOS	9	3	1	37	13	81	11	2	0	100	47	11	0	100	17	4	0
	5	3	1	27	2	73	14	2	0	100	43	13	0	100	21	3	0
	2	6	2	32	8	78	21	0	0	100	23	10	0	100	32	3	0
promedio	5.33	4.00	1.33	32.00	7.67	77.00	15.33	1.33	0.00	100.00	37.67	11.33	0.00	100.00	23.33	3.33	0.00
% VIVOS	93.63	98.41	100.40	51.39	114.74	5.98	67.33	105.58	119.52	0.00	47.81	104.38	119.52	0.00	60.56	97.21	119.52
% muertos	6.37	1.59	-0.40	48.61	-14.74	94.02	32.67	-5.58	-19.52	100.00	52.19	-4.38	-19.52	100.00	39.44	2.79	-19.52

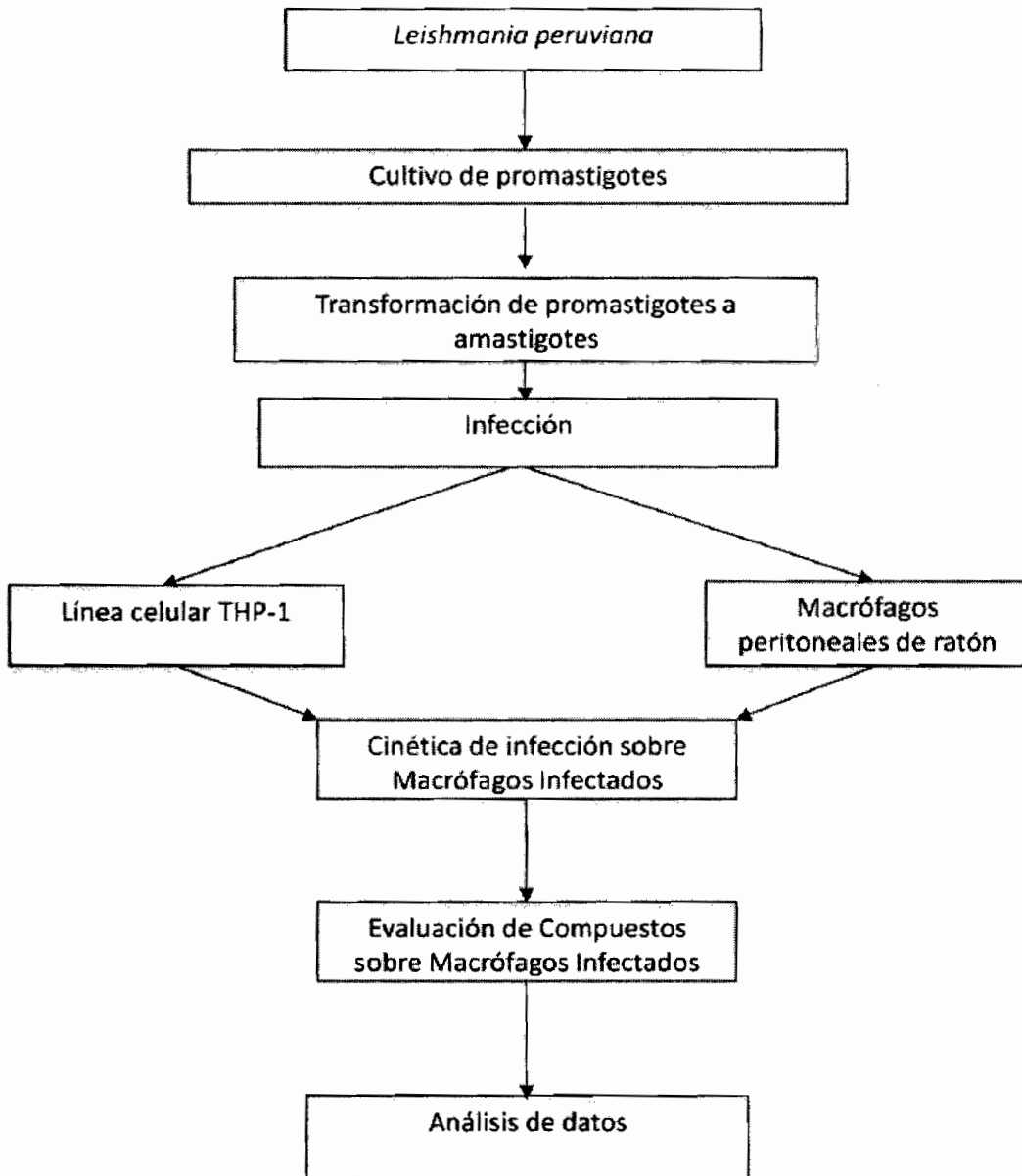
L106.06 100µg/ml	L106.06 10µg/ml	L106.06 1µg/ml	L106.06 0.1µg/ml	L406.15 100µg/ml	L406.15 10µg/ml	L406.15 1µg/ml	L406.15 0.1µg/ml	L609.09 100µg/ml	L609.09 10µg/ml	L609.09 1µg/ml	L609.09 0.1µg/ml	L609.10 100µg/ml	L609.10 10µg/ml	L609.10 1µg/ml	L609.10 0.1µg/ml	SKE 10µg/ml	SKE 1µg/ml
4	33	62	100	2	72	100	100	1	64	100	100	4	69	100	100	52	72
1	31	81	100	3	69	100	100	0	92	100	100	1	73	100	100	49	61
1	14	73	100	7	77	100	100	8	53	100	100	2	83	100	100	49	75
2.00	26.00	72.00	100	4.00	72.67	100	100	3.00	69.67	100	100	2.33	75.00	100	100	50.00	69.33
81	23	1	0	31	6	0	0	71	5	0	0	53	2	0	0	13	4
73	39	12	0	71	5	0	0	62	1	0	0	59	3	0	0	7	3
62	11	8	0	61	3	0	0	69	1	0	0	62	4	0	0	12	1
72.00	24.33	7.00	0.00	54.33	4.67	0.00	0.00	67.33	2.33	0.00	0.00	58.00	3.00	0.00	0.00	10.67	2.67
2.39	31.08	86.06	100	4.78	86.85	119.52	119.52	3.59	83.27	119.52	119.52	2.79	89.64	119.52	119.52	59.76	82.87
97.61	68.92	13.94	100	95.22	13.15	-19.52	-19.52	96.41	16.73	-19.52	-19.52	97.21	10.36	-19.52	-19.52	40.24	17.13

III. FLUJOGRAMA

a) *Leishmania amazonensis*



b) *Leishmania peruviana*



IV. PROTOCOLOS

1). Extracción de macrófagos peritoneales de *ratones* BALB/c

PREVIAMENTE:

- 1) Desinfectar con etanol al 70%, la zona de trabajo, la tabla de disección y el material de disección
- 2) Dejar por 15 minutos con luz ultravioleta todo el material de trabajo necesario para este ensayo:
 - a. Micropipetas P20, P200 y P1000.
 - b. Tips de 100 y 1000µl estériles.
 - c. Placa de cultivo células de 96 pozos (placa petri o material que desea emplear).
 - d. Laminillas de vidrio de 4 x 4 mm estériles.
 - e. Tubo eppendorf de 1. 5ml.
 - f. Jeringas de 10ml c/ aguja 21G x 1. 5" estériles.
 - g. Placa petri de cultivo celular de poliestireno de 60/15mm.
 - h. Agujas de 26 ½" G estériles.
 - i. Frasco de desecho.
 - j. Pinza sumergida en un frasco con alcohol 70°
- 3) Colocar 5µl de neutral red en el tubo de microcentrifuga de 1. 5ml.
- 4) Cargar las jeringas de 10ml con 5ml de medio M199 10% SFB(medio para extraer macrófagos), inmediatamente cambiar las agujas 21G x 1. 5"(sin desecharlas) por s agujas 26 G x ½", y enfriar a 4°C.
- 5) Sellar con parafilm la placa petri de poliestireno y llevarlas a congelar a -20°C.
- 6) Colocar una laminilla de vidrio en cada pozo de la placa de cultivo celular de 96 pozos.

Para la extracción de los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal es necesario sacrificar al animal, el cual se debe realizar siguiendo los procedimientos y normas estandarizadas como por ejemplo: utilizando una cámara de CO₂ o cámara letal de cloroformo.

- 7) Se extiende al ratón (es) estirando las extremidades y sujetándolas con agujas en una tabla de disección.
- 8) Posteriormente se desinfecta el abdomen del ratón con etanol al 70%, luego se procede a cortar la piel de la parte baja del abdomen teniendo sumo cuidado de no cortar el peritoneo.
- 9) Utilizando una pinza desinfectada levantar levemente el peritoneo e inyectar 5ml de medio de cultivo M199 10%SFB frío utilizando la jeringa con una aguja N° 26G x ½ pulgada previamente cargada, se inyectará en la cavidad peritoneal teniendo cuidado de no inyectar en órganos o vísceras.
- 10) Realizar masajes suaves por 1 minuto aproximadamente, para agitar el medio contenido dentro de la cavidad peritoneal del ratón.
- 11) Posteriormente, introduciendo cuidadosamente la aguja en la parte lateral de la cavidad abdominal, se procederá a extraer el medio de cultivo utilizando la misma jeringa de 10 ml con una aguja de 21G por 1 ½ pulgada.
- 12) El medio extraído se vierte sobre la placa petri de poliestireno que se enfrió a -20°C.
- 13) Luego, con mucho cuidado y rápidamente se coloca 100µl del medio extraído sobre cada pozo de la placa de cultivo celular de 96 pozos.
- 14) Colocar 95µl del medio extraído en el tubo de 1.5ml que contiene al reactivo neutral red, mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos para la cuantificación de macrófagos.
- 15) Llevar la o las placas de 96 pozos a la incubadora de 37°C 5%CO², por 2 horas.
- 16) Después de esto, lavar la placa de 96 pozos con medio M199 simple temperado a 37°C. Repetir este paso 2 veces.
- 17) Luego, incubar los macrófagos a 37°C 5% CO₂ con 100µl de medio M199 10%SFB

Todos los puntos arriba mencionados, a excepción de los números 7, 8, 9, 10 y 11, se realizan en la cabina de flujo laminar.

Desinfección del ratón con Etanol 70%



Se corta la piel de la parte baja del abdomen



Se separa la piel del peritoneo



Se corta la piel ratón



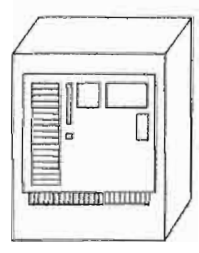
Se extrae el líquido de extracción de la cavidad peritoneal



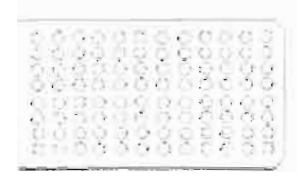
Se Inyecta el liquido de extracción



Incubar a 37°C 5%CO₂



Colocar 100 ul del medio extraído

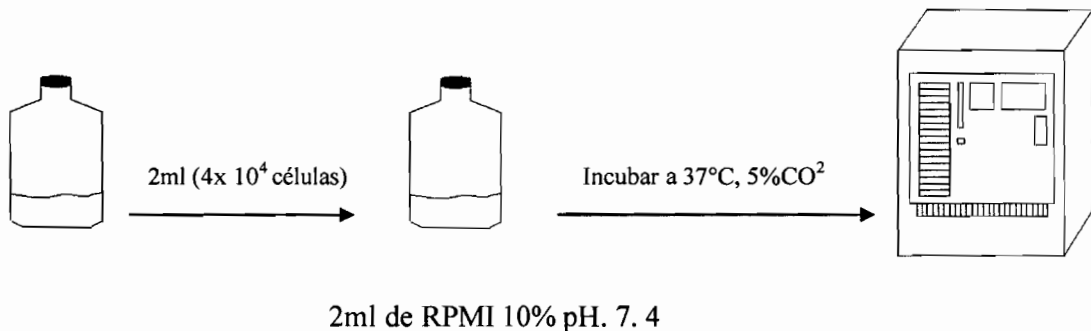


2). Mantenimiento y Diferenciación de las células THP1

Las células THP1 crecen en medio RPMI 1640, conteniendo 10% de SFB y suplementado con antibióticos: Penicilina 100 U/ml y Estreptomicina 100 µg/ml.

- 1) En un frasco de cultivo celular de 25 cm², se coloca 2 ml de medio RPMI 1640 10% SFB.
- 2) Llevar el frasco con el medio de cultivo a la incubadora de 37°C 5%CO₂ y dejarlo temperar por 30 minutos.
- 3) Luego, agregar 2 ml de medio de cultivo con la línea celular THP-1 no diferenciada y volverlos a la incubadora de 37°C, 5% CO₂.

Los repiques de mantenimiento se realizan cada 48 horas, en la cabina de flujo laminar (ambiente estéril).



Diferenciación

Las línea celular THP1 son células inmaduras (pre - monocíticas) incapaces de cumplir su función fagocítica, es por ello que se necesita inducir su diferenciación (proceso en el cual las células adquieren una forma y una función determinada) a células maduras capaces de fagocitar.

Para la diferenciación de las células pre-monocíticas THP1 a células macrófagos, es necesario tratar las células con el reactivo PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) a una concentración de 40 ng/ml, y esto se realiza de la siguiente manera:

Previamente:

- 1) Realizar un cultivo en masa de las células THP-1 no diferenciadas.

Luego:

- 2) Se coloca el cultivo de células en un tubo cónico de 15ml y se centrifuga a 200g por 10 minutos a 4°C.
- 3) Se retira el sobrenadante y el pellet de células se resuspende en 3ml de medio RPMI 1640 10%SBF. Extraer una alícuota para observar la viabilidad y el número de células / ml
- 4) Posteriormente, en un volumen final de 50µl se coloca 2×10^4 cel/pozo.
- 5) Adicionar en cada pozo 50µl de medio RPMI 10%SBF con PMA a 80 ng/ml. Teniendo un volumen final de 100 ul a una concentración de 40 ng/ml
- 6) Incubar las células por 48 horas a 37°C con 5% CO₂.
- 7) Después de tiempo de inducción a la diferenciación, se lava las células dos veces con medio RPMI 1640 simple temperado a 37°C, finalmente se coloca 100 uL de medio RPMI 10%SBF temperado y se incuba a 37°C con 5% de CO₂.