

Estudio de la infección de Leishmanias del complejo Viannia mediante citometría de flujo y coloración de Giemsa empleando líneas de macrófagos humanos y murinos (U-937 y J-774)

Yuly Andrea Gamboa Marín^{1,2}, Gabriela Delgado Murcia²

¹ Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Bogotá, D.C. Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Grupo de Investigación en Inmunotoxicología. A.A. 14490. Bogotá, D.C. Colombia. Correo electrónico: lgdelgadam@unal.edu.co

Recibido para evaluación: diciembre 26 de 2007

Aceptado para publicación: abril 28 de 2008

RESUMEN

Ante las dificultades frente al tratamiento de la leishmaniasis, es importante buscar alternativas terapéuticas que deben ser analizadas empleando modelos *in vitro* e *in vivo* adecuadamente estandarizados. Con este propósito, se implementó un modelo de infección *in vitro* de *Leishmania* con macrófagos U-937 y J-774, para evaluar la internalización de promastigotes a distintos puntos tiempo (2 a 6 horas) y por dos técnicas: coloración de Giemsa (CG) y citometría de flujo (CF). En el análisis por CF, se evaluó la invasión teniendo en cuenta la emisión de fluorescencia de los parásitos transfectados con la proteína verde de fluorescencia (GFP) y el aumento de la densidad citoplasmática de los macrófagos debida a los parásitos internalizados, lo cual fue verificado con el recuento microscópico realizado con CG; se encontró que a una proporción 1:35 (células:parásitos) se pueden establecer cambios densitométricos asociados con la infección empleando cepas de parásitos no transfectadas. También se describe que las J774 internalizan más eficientemente promastigotes de *Leishmania* que las células U937 (P valor: 0,0006), y se observa a su vez para la línea murina un aumento del número de parásitos por célula, respecto a los macrófagos humanos empleados en este ensayo (P valor 0,0038). Este estudio nos permite concluir: (i) que los cambios en la densidad citoplasmática evidenciados por CF son suficientes para establecer el porcentaje de infección parasitaria, aun para aquellos parásitos no transfectados; (ii) que la CG es menos costosa que el uso de la CF para evaluar infección parasitaria, aunque por su carácter semicuantitativo, la variabilidad intra- e inter-observadores la hace menos precisa; (iii) que los resultados cuantitativos obtenidos por la CF se correlacionan con los observados en la CG, y permiten sugerir que estas dos técnicas resultan complementarias; y (iv) que el porcentaje de infección y el número de parásitos

internalizados para la J-774 son mayores que lo encontrado para la U-937, lo cual puede deberse a que un mayor número de receptores de complemento sobre la línea murina favorece la internalización de patógenos intracelulares, proceso menos favorecido en la línea humana por los niveles reducidos de este tipo de receptores en su membrana celular.

Palabras clave: Infección *in vitro* por *Leishmania*, citometría de flujo (CF), coloración de Giemsa (CG), macrófagos, promastigotes.

SUMMARY

Study of *Leishmania Viannia* infection by means of flow cytometry and Giemsa stain using human and murine macrophage lines (U-937 and J-774)

The treatment for Leishmaniasis has presented some difficulties related with adverse effects and resistance. For these reasons it is important to search therapeutic alternatives which must be analyzed using adequately standardized *in vitro* and *in vivo* models. With this purpose, we implemented an *in vitro* model for leishmania infection using U-937 and J-774 macrophages, and evaluating promastigote internalization at consecutive time spans (from 2 to 6 hours). The first approximation assayed involves the flow cytometric (CF) analysis for invasion quantification by measuring the fluorescence emitted by parasites previously transfected with green fluorescence protein (GFP). In the alternative strategy, parasitized cells were subjected to Giemsa stain and CF was applied to measure the increase of macrophages cytoplasm density owed to internalized parasites. Giemsa stain also allowed us to estimate the number of parasites within each cell. We report that the presence of 35 parasites per macrophage produces an increase in cytoplasmic density enough to be detected by CF so that infection can be clearly reported. We also found that J-774 macrophages internalize *Leishmania* promastigotes more efficiently than U-937 cells (P value: 0.0006). Cells of the murine line were infected by a higher number of parasites than the human counterparts used in this study (P value 0.0038). From the results, we conclude: (i) the change in macrophage cytoplasm density demonstrated by CF after Giemsa stain are sufficient to estimate the percentage of infection. (ii) Giemsa stain provides a less expensive strategy to evaluate *Leishmania* infection than the fluorescence based option, although the intra and inter observer variability (semi-quantitative procedure) makes it less precise; (iii) quantitative results obtained by both techniques correlate to each other, suggesting that these two tools can be considered complementary; and (iv) both the percentage of infection and the number of internalized parasites are higher for J-774 than for U-937 macrophages. This probably suggests the presence of more receptor molecules (binding targets) for *Leishmania* ligands on the murine cell membrane determining a more efficient internalization rate than in human macrophages.

Key words: *In vitro* *Leishmania* infection, flow cytometry (CF), Giemsa stain (CG), macrophages, promastigotes.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania*, que invade tejidos de varias especies de vertebrados, entre ellos el hombre, la cual presenta diferentes manifestaciones clínicas y grado de severidad (1). Es una patología con enorme incidencia en Colombia (2), que constituye un serio problema de salud pública, y cuya forma clínica predominante es la leishmaniosis cutánea, causada principalmente por parásitos del complejo *Leishmania Viannia* (3).

La capacidad de *Leishmania* para infectar el huésped vertebrado depende de su aptitud de sobrevivir en células del linaje fagocítico-mononuclear (4). Este proceso puede realizarse *in vitro*, empleando diversos tipos celulares derivados de médula ósea (5), células de McCoy, (6), macrófagos murinos como J774 (7) y macrófagos humanos como U937 (8), que fagocitan promastigotes y permiten la morfogénesis intracelular al estadio de amastigote, simulando de este modo el proceso de infección natural.

Ante la ausencia de una vacuna segura y efectiva y con el enorme problema en torno a los efectos adversos de la farmacoterapia de elección, es trascendental realizar estudios *in vitro* en busca de alternativas terapéuticas. Para realizar estas investigaciones es necesario trabajar con procedimientos que reflejen las condiciones encontradas *in vivo* por los parásitos en la célula huésped, que resulten sencillos, reproducibles y confiables (9). Diversos grupos de investigación en el mundo han centrado sus esfuerzos en estudiar nuevos candidatos a fármacos para controlar la leishmaniasis evaluando, por ejemplo, compuestos con potencial leishmanicida a partir de recursos naturales o péptidos antimicrobianos con actividad sobre formas parasitarias de especies de *Leishmania* del nuevo mundo. Por esta razón, se implementó el modelo de infección por *Leishmania* en macrófagos *in vitro* y se evaluó el índice de invasión, empleando dos técnicas: coloración de Giemsa (CG), una técnica de uso cotidiano, semicuantitativa, rápida, reproducible y económica; y citometría de flujo (CF), un procedimiento cuantitativo, de gran exactitud, aunque de mayor costo. De esta forma, el modelo de infección y las técnicas mencionadas son en conjunto una herramienta que permite determinar el efecto leishmanicida de diversas sustancias y en ocasiones establecer posibles mecanismos de acción.

Para realizar la evaluación de la infección por *Leishmania* en macrófagos llevada a cabo por CF se tuvo en cuenta la emisión de fluorescencia de los protozoos transfectados y el aumento de la densidad citoplasmática de las células cuando internalizaron parásitos no transfectados. De igual forma, por CG fue posible confirmar el resultado y descartar posibles interferencias causadas por artefactos captados como señales o eventos en el procedimiento fluorocitométrico.

Se encontraron diferencias en los niveles de infección entre las líneas celulares y se correlacionaron con la naturaleza y mecanismo de acción de receptores parasitarios expresados sobre las células blanco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Las cepas de *Leishmania Viannia panamensis* (*L. panamensis*) MHOM/PA/71/LS94 y *Leishmania Viannia guyanensis* (*L. guyanensis*) MHOM/BR/75/M4147 fueron gentilmente proporcionadas por la doctora Clemencia Ovalle, del Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta de Bogotá, Colombia. La cepa de *L. panamensis* transfectada con gfp (*Green Fluorescence Protein*) MHOM/CO/87/UA140 GFP fue proporcionada por la doctora Sara Robledo, del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-Pecet de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia. Los parásitos fueron cultivados en medio de cultivo RPMI (GIBCO, Escocia, Reino Unido) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Microgen, Bogotá, Colombia) al 10%, a una temperatura de 27°C a humedad y gasificación ambientales.

Cultivo de las líneas de macrófagos humanos (U-937) y murinos (J-774)

Estas líneas de macrófagos de fenotipo adherente fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO, Escocia, Reino Unido) con SFB al 10%, a una temperatura de 37° C con 95% de humedad y 5% de CO₂. Esta línea celular ha sido caracterizada comparativamente con células de fenotipo no adherente y activadas con inductores, y se ha encontrado, de adherencia e internalización de microorganismos intracelulares, un comportamiento intermedio [menor que las activadas y mayor que las no activadas (datos no mostrados)]. Las líneas celulares fueron gentilmente donadas por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (Fidic).

Ensayos de infección

Dichos ensayos de infección de *Leishmania* a macrófagos se realizaron a diferentes puntos tiempo de incubación (de 2 a 6 horas con intervalos de una hora), con el fin de establecer el período en el cual se observara mayor porcentaje de parásitos intracelulares. La evaluación de la infección fue realizada por CG y CF.

(i) *Procedimiento para el estudio por CG*: 3×10^5 células/mL de cada línea de macrófagos (U-937 y J-774) fueron sembradas en cajas de Petri estériles plásticas de 35 x10mm (BD, San Diego, CA, EE.UU.), en un volumen final de 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB. Tras dos horas de adherencia, las células fueron cocultivadas con una concentración de $1,5 \times 10^7$ parásitos/mL (*L. panamensis* y *L. guyanensis*) guardando siempre la proporción 1:35 [(células/parásitos), esta concentración fue seleccionada para tener el mismo parámetro de infección en los dos ensayos, CG y CF]. Como control de la tinción se emplearon células sin infectar. De cada caja se hicieron seis réplicas, correspondientes a cada uno de los puntos tiempo para evaluar. Una vez colocados los parásitos, las células infectadas fueron llevadas a incubación (37° C) por 2, 4, 5 y 6 horas (h) y lavadas con solución

salina fisiológica amortiguada con sales de fosfatos pH 7,4 (PBS) estéril al término de cada período, con el fin de remover los parásitos no internalizados. Una vez retirados los parásitos libres, las células fueron colocadas nuevamente en medio de cultivo, hasta completar las seis horas totales de incubación. Una vez finalizadas las seis horas, todas las cajas fueron lavadas con PBS y secadas a temperatura ambiente. Posteriormente, cada preparación se fijó con alcohol metílico al 99,5% (Chemi, S.A.) durante 5 minutos. La solución Giemsa se preparó en proporción 1:50, diluyendo el colorante en solución tamponada a pH 7,4. Las preparaciones fueron expuestas a la solución colorante por períodos definidos para cada línea celular (30 segundos de exposición para la línea celular J-774 y un minuto para la línea celular U-937). Al cabo de este tiempo, se retiró la solución colorante y se analizó el porcentaje de infección en microscopio de luz bajo objetivo de 100x. Para efectuar el respectivo conteo, se realizó el recuento de 100 a 200 células totales (estimando tanto células infectadas como no infectadas), con el fin de establecer el porcentaje de infección (porcentaje de células infectadas = N° de células infectadas x total de células contadas / 100).

(ii) *Procedimiento para el estudio por CF:* Concentraciones de 3×10^4 células/mL y 1×10^6 parásitos (1:35 células/parásitos) fueron cocultivadas en placas de 24 pozos en un volumen final de 1 mL de medio suplementado con 10% de SFB, en las mismas condiciones del procedimiento para CG (tras haber ensayado diluciones 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 y 1:50, se encontró que a 1:35 se evidenciaban mejor cambios en la densidad celular por CF al emplear promastigotes no transfectados]. En este procedimiento se incorporó la línea parasitaria de *L. panamensis* gfp. Los tiempos de incubación corresponden a los mismos descritos para el ensayo de infección analizado por CG. Tras el tiempo total de incubación (seis horas) las células se desprendieron de la placa, se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 2500 r.p.m. El botón celular fue resuspendido nuevamente en 500 μ L de PBS y lavado en dos oportunidades por centrifugación. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200 μ L de PBS y transferidas a tubos de citometría para su subsecuente análisis. Se adquirieron 10.000 eventos de cada una de las muestras en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.). Las muestras fueron adquiridas bajo la evidencia de parámetros como complejidad (*Side Scatter*: SSC) y tamaño celular (*Forward Scatter*: FSC). Para los parásitos transfectados se analizó la fluorescencia emitida por los parásitos en el canal FL-1.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados fueron analizados empleando la plantilla creada en el programa Cell-Quest (Becton Dickinson) para cada una de las subpoblaciones. La prueba T de Student fue aplicada para hacer comparaciones múltiples y establecer entre cuáles tratamientos se encontraba la diferencia significativa.

RESULTADOS

Se logró evidenciar la presencia de amastigotes intracelulares y establecer diferencias entre las células infectadas y las que no lo estaban (Figura 1). No obstante, y con el fin de establecer el porcentaje de infección, los recuentos fueron realizados por cuatro observadores diferentes. Se encontró no sólo una gran variación interobservadores, sino una variabilidad en el porcentaje de infección dependiente del tiempo de incubación (Figura 2). Como se observa, el índice de infección varía en cada tiempo de incubación, e inesperadamente para las J-774 infectadas con *L panamensis* existe una notable disminución de la infección a las cinco horas de incubación. De las líneas celulares empleadas, se observa que J-774 favorece ampliamente la infección parasitaria comparativamente con la U-937 [El promedio de la IMF de los parásitos internalizados por las J774 fue de $1,179 \pm 573,71$ mientras que para las U937 fue de $144,32 \pm 21,06$ (P valor: 0,0038)].

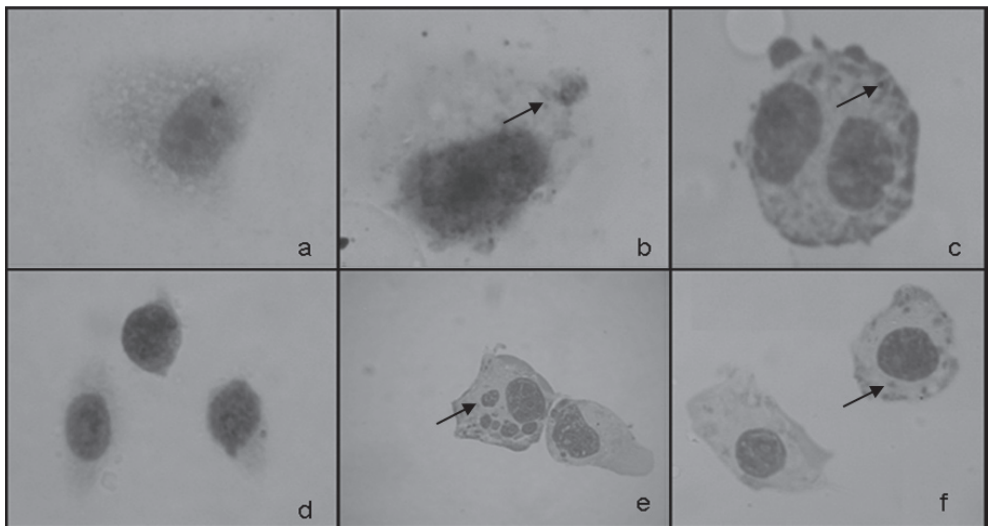


Figura 1. Evaluación de la infección de promastigotes a macrófagos por CG. La figura presenta las preparaciones coloreadas con Giemsa (a) J-774 sin infectar, (b) J-774 infectada por 4 h, (c) J-774 infectada por 6 horas, (d) U-937 Sin infectar, (e) U-937 infectada por 4 h, (f) U-937 infectada por 6 horas. La flecha señala la presencia de parásitos internalizados en cada línea celular. Estos resultados son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente.

La Figura 3 muestra el cambio en el espectro de fluorescencia de los parásitos transfectados una vez internalizados en cada línea celular. La línea J-774 presenta mayor número de parásitos internalizados, de acuerdo con el desplazamiento de la población M2 en los histogramas presentados. La evaluación de la infección se realizó

analizando el parámetro de complejidad celular (Side Scatter: SSC) frente a la fluorescencia emitida por los parásitos transfectados en el canal FL-1 (porcentaje establecido para el cuadrante de dobles positivas). En la Figura 4 se muestra la cinética de infección a diversos puntos tiempo. Los resultados se expresan en porcentajes y corresponden al promedio (con desviación estándar) de los tres experimentos realizados de forma independiente.

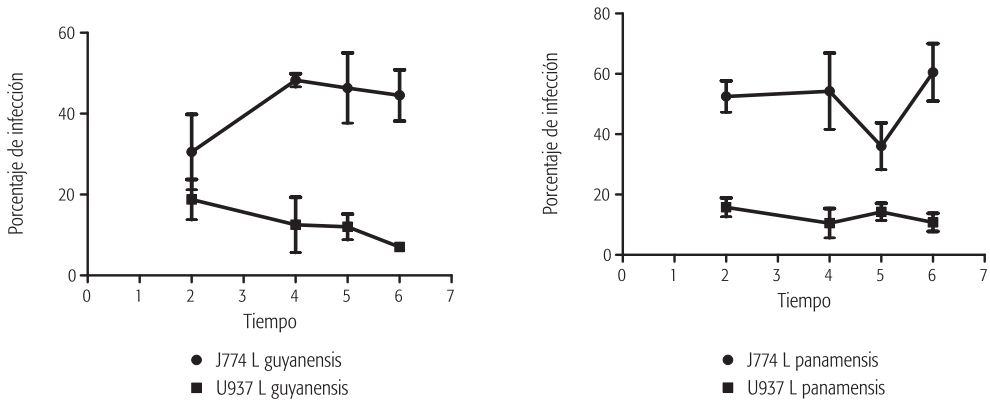


Figura 2. Porcentaje de infección de *Leishmania* a macrófagos por CG. La figura muestra el porcentaje de infección a cuatro puntos de incubación diferentes en un periodo total de 6 horas. Estos datos son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente. Las desviaciones estándar representan la variabilidad de los conteos realizados por cuatro analistas diferentes.

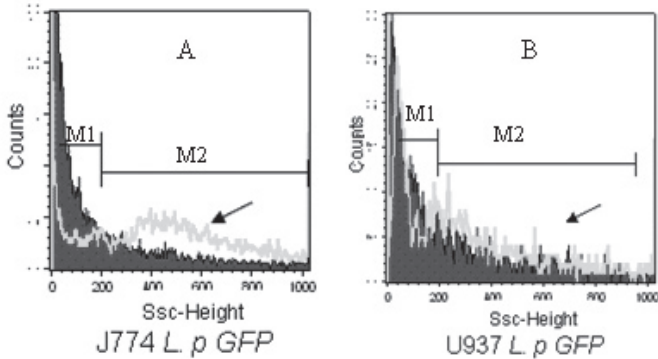


Figura 3. Figura representativa de la infección de *Leishmania* a macrófagos por CF. Los histogramas representan la presencia de *L. panamensis* GFP luego de 6 horas de co-incubación con J-774 (Panel A) y U-397 (Panel B). Los histogramas rellenos, muestran el desplazamiento de la población de macrófagos de cada línea sin infectar, mientras que las líneas sin relleno, equivalen a las señales emitidas por los parásitos fluorescentes internalizados y cuantificados en M2. La flecha señala el desplazamiento de las señales del parásito transfectado respecto a las células sin infectar.

Los histogramas representan la presencia de *L. panamensis* GFP luego de seis horas de co-incubación con J-774 (Panel A) y U-397 (Panel B). Los histogramas rellenos, muestran el desplazamiento de la población de macrófagos de cada línea sin infectar, mientras que las líneas sin relleno, equivalen a las señales emitidas por los parásitos fluorescentes internalizados y cuantificados en M2. La flecha señala el desplazamiento de las señales del parásito transfectado respecto a las células sin infectar.

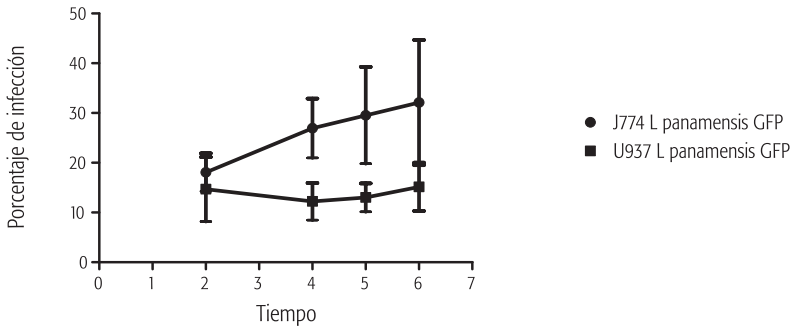


Figura 4. Porcentaje de infección de *Leishmania* a macrófagos por CF. Acorde a los porcentajes reportados por CellQuest en M2, se gráfico esta cinética de infección. Estos resultados son representativos de tres experimentos realizados de forma independiente.

La Figura 5 muestra que al analizar sólo el parámetro de SSC por CF se observa un aumento en la densidad citoplasmática suficiente para establecer una cinética de infección para promastigotes no fluorescentes de *L. panamensis* en macrófagos humanos y murinos.

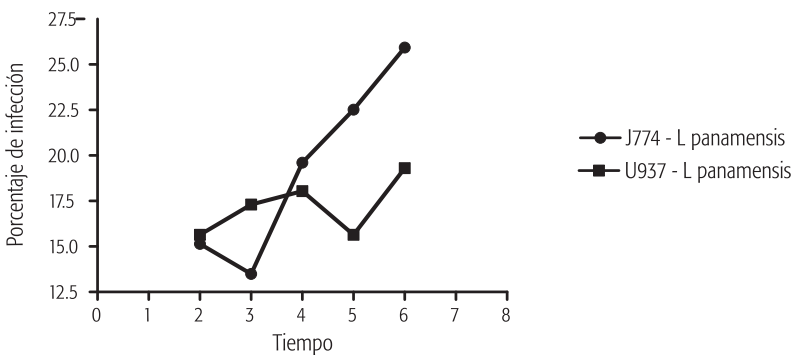


Figura 5. Porcentaje de infección de *L. panamensis* no transfectada con GFP a macrófagos por CF. La figura muestra el porcentaje de infección detectado en SSC luego de 2, 3, 4, 5, y 6 horas de co-incubación parásitos-macrófagos. Este resultado es representativo de dos ensayos realizados de forma independiente.

DISCUSIÓN

El análisis por ambas técnicas (CG y CF) muestra un aumento gradual del porcentaje de infección, dependiente del tiempo de exposición a los parásitos, sobre ambas líneas celulares. Sin embargo, se observa por CG una inesperada disminución a las cinco horas, asociada probablemente a fallas técnicas propias del procedimiento, tales como el desprendimiento de las células infectadas o por lavado excesivo durante la remoción de parásitos libres (Figura 2). Al igual que lo observado por CG (excepto la baja parasitaria a las cinco horas), la línea celular J-774 presenta mayor índice de infección por la *L. panamensis* gfp que U-937. Se muestra un aumento gradual de la infección, y se observando un mayor porcentaje a las seis horas. De acuerdo con la intensidad media de fluorescencia (IMF), los resultados obtenidos por CF permiten también establecer un aproximado del número de parásitos internalizados. Teniendo en cuenta este parámetro, se encontró que no sólo las células J-774 se infectaban en mayor proporción [resultado estadísticamente significativo respecto a los macrófagos humanos (P valor: $\leq 0,0006$)], sino que el número de parásitos que lograban ser fagocitados era también mayor para esta línea murina. Al comparar los resultados obtenidos por CF con la CG, se encuentra un aumento aparente en la infección de las células murinas comparadas con los macrófagos humanos [se menciona como aparente por la dificultad de realizar un recuento preciso del número de parásitos de parásitos por célula; es decir, se observa un aumento cualitativo en el índice parasitario (datos no mostrados)]. Relacionado con lo anterior, las líneas celulares empleadas provienen de mamíferos susceptibles a infección por *Leishmania* y pertenecen al linaje fagocitocomononuclear. Sin embargo, en cuanto a los receptores que facilitan la internalización de los patógenos, en este caso *Leishmania*, sí se encuentran diferencias entre las líneas de macrófagos empleadas en este estudio. Se ha logrado establecer que moléculas abundantes sobre la membrana celular del parásito como el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína Gp-63 interactúan con receptores para el complemento como CR1 y CR3, proceso crítico para la internalización y curso de la infección (10). Otro de los receptores que se ha definido como fundamental en la fagocitosis parasitaria es el receptor para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FcR); sin embargo, su acción depende del efecto sinérgico con el receptor de CR3 del complemento. En ensayos *in vitro*, en los cuales se emplearon anticuerpos monoclonales para bloquear los receptores, se encontró que neutralizando solamente el receptor FcR no se redujo la fagocitosis de promastigotes. No obstante, al bloquear simultáneamente FcR y CR3, se redujo ostensiblemente el ingreso de los parásitos (11). De los receptores presentes en las líneas celulares empleadas en este estudio, se sabe que J-774 expresa en mayor proporción CR1 y CR3 (más que CR1), mientras que U-937 expresa cantidades mínimas de estos dos receptores (12). Ésta es, quizá, la explicación más acertada del por qué la J-774 muestra mayores niveles de infección que las U-937, en las que probablemente la ausencia del receptor FcR en la línea humana hace deficiente el proceso de fagocitosis, efectivamente realizado por la línea murina que presenta ambos receptores.

Si bien el empleo de parásitos transfectados permite evidenciar con claridad la cinética de infección y por ende su empleo para dilucidar el potencial antiparasitario de nuevos fármacos, no todos los laboratorios cuentan con estas cepas para sus estudios. Por esta razón decidimos emplear cepas de parásitos no transfectados para analizar la infección a macrófagos. Aunque los resultados aquí reportados no permiten establecer diferencias tan marcadas como cuando se emplean cepas transfectadas (13), anticuerpos específicos (9) y otros fluorocromos (14), que por su condición favorecen su análisis fluorocitométrico, los cambios encontrados en SSC hacen que por CF se puedan realizar estudios de infección. Es importante resaltar que se necesita la suficiente caracterización de los marcadores de superficie de las células U937, con el fin de establecer con mayor claridad las diferencias encontradas respecto a las J774.

A pesar de que la CF es una técnica cuantitativa y reproducible, la evidencia de parásitos internalizados por técnicas semicuantitativas como el Giemsa funda su importancia en la observación de los parásitos fagocitados. Es decir, células con parásitos simplemente adheridos, mas no internalizados, pueden ser detectadas como falsas señales positivas por CF, y aunque la posibilidad es mínima y se puede sustraer si se han contemplado los respectivos controles, es un factor de error inherente a las dos técnicas. Lo anterior nos permite sugerir que la CF, si bien tiene ventajas superiores principalmente aquellas relacionadas con la variabilidad de los observadores, no sustituye (por lo que hace relación a la especificidad) la observación microscópica evidenciada en la CG. La CF es una herramienta cuantitativa y rápida para evaluar la infección; sin embargo, cambios morfológicos como vacuolización o granulaciones tóxicas en la célula blanco quizá sean mejor detectados por la observación microscópica (CG). En cuanto a costo beneficio, si bien el valor de un citómetro de flujo no es equiparable con el de un microscopio de luz, por lo que respecta a sensibilidad, especificidad y costo de materiales y consumibles, las dos herramientas resultan comparables (el valor aproximado de un análisis por CF que emplee parásitos sin transfectar es de 10 dólares americanos, mientras que usando parásitos transfectados el costo asciende a 17; el valor de un análisis por CG es de cinco dólares), lo que a nuestro juicio permite sugerir que CF y CG son dos técnicas complementarias cuyo empleo de forma simultánea es importante para evaluar la infección de *Leishmania* en macrófagos. El modelo de infección aquí estandarizado y las metodologías empleadas resultan útiles para realizar estudios no sólo con *Leishmania*, sino con otros patógenos intracelulares.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a todos los integrantes del Grupo de Investigación en Inmunotoxicología del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias y a los doctores Pedro Duarte y Roberto Amador, del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia

por colaborarnos en la toma de las microfotografías. Al PECET de la Universidad de Antioquia, en particular al doctor Iván Darío Vélez, a la doctora Sara Robledo y a Diana Lorena Muñoz. Al Grupo Funcional de Inmunología Molecular de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Agradecemos de manera especial a la compañía Becton Dickinson de Colombia por facilitarnos el uso del citómetro de flujo en calidad de apoyo tecnológico y a la docencia. Este proyecto pudo ser realizado con los recursos asignados por la Dirección de Investigación, sede Bogotá (DIB), de la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto aprobado No. 2020100946) y Colciencias - Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" mediante el proyecto 110140820378.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. Botero y M. Restrepo, Parasitosis Humanas, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, 2003, 1, p. 504.
2. N. G. Saravia y R. S. Nicholls, Leishmaniasis: un reto para la salud pública que exige concertación de esfuerzos y voluntades, *Biomedica*, **26** (supl. 1), 7 (2006).
3. C. E. Ovalle, L. Porras, M. Rey, M. Ríos y Y. C. Camargo, Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E, 1995-2005, *Biomedica*, **26** (supl. 1), 145 (2006).
4. J. Alexander, A. R. Satoskar y D. G. Russell, Leishmania species: models of intracellular parasitism, *J Cell Sci*, **112**, 2993 (1999).
5. S. E. Cotterell, C. R. Engwerda y P. M. Kaye, Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha, *Blood*, **95**, 1642 (2000).
6. Y. L. Nogueira, P. M. Nakamura y E. A. Galati, Kinetics of growth of Leishmania (Leishmania) chagasi cycle in McCoy cell culture, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **48**, 337 (2006).
7. M. N. Rodríguez-Cabezas, C. M. Mesa-Valle, S. Azzouz, V. Moraleda-Lindez, D. Craciunescu, M. T. Gutiérrez-Ríos, M. I. De Frutos y A. Osuna, In vitro and in vivo activity of new rhodium (III) complexes against Leishmania donovani, *Pharmacology*, **63**, 112 (2001).
8. J. A. Streit, J. E. Donelson, M. W. Agey y M. E. Wilson, Developmental changes in the expression of Leishmania chagasi gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line, *Infect Immun.*, **64**, 1810 (1996).

9. D. Sereno, A. Cordeiro da Silva, F. Mathieu-Daude y A. Ouaisi, Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures, *Parasitol Int.*, **56**, 3 (2007).
10. A. Awasthi, R. K. Mathur y B. Saha, Immune response to Leishmania infection, *Indian J Med Res.*, **119**, 238 (2004).
11. R. A. Guy y M. Belosevic, Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages, *Infect Immun.*, **61**, 1553 (1993).
12. L. K. Husmann y W. Johnson, Adherence of Legionella pneumophila to Guinea Pig Peritoneal Macrophages, J774 Mouse Macrophages and Undifferentiated U937 Human Monocytes: Role of Fc and Complement Receptors, *Infect Immun.*, **60**, 5212 (1992).
13. A. Plock, W. Sokolowska-Kohler y W. Presber, Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on Leishmania Spp, *Exp Parasitol.*, **97**, 141 (2001).
14. J. D. Berman y J. V. Gallalee, Semiautomated assessment of in vitro activity of potential antileishmanial drugs, *Antimicrob Agents Chemother.*, **28**, 723 (1985).