

## Caracterización del proceso de metaciclologénesis *in vitro* de promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*

Karla Fabiola Chacón-Vargas<sup>1</sup>; Gerardo Corral-Ruiz<sup>2</sup>; Luvia Enid Sánchez-Torres<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitario, s/n, 31125 Chihuahua, Chih., México. <sup>2</sup> Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, s/n, 11340 Ciudad de México, México.

### ABSTRACT

#### Characterization of the *in vitro* metacyclogenesis process of *Leishmania (Leishmania) mexicana* promastigotes

**Introduction.** Leishmaniasis is a spectrum of vector-borne diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania sp.* In Mexico, species of the *Leishmania (L.) mexicana* complex are endemic and cause cutaneous leishmaniasis. During the development of the parasite in the vector and in culture, the process of metacyclogenesis has been described, which consists of morphological and biochemical changes for the transformation of procyclic promastigotes into metacyclic promastigotes.

**Objective.** To characterize the process of metacyclogenesis in axenic cultures of *Leishmania (L.) mexicana*.

**Materials and methods.** In promastigote cultures of *L. (L.) mexicana*, different parameters were evaluated daily for 15 days to determine changes over time. Cellularity, morphology, and cell viability parameters were analyzed by optical microscopy and flow cytometry.

**Results.** In the growth curve, three stages were identified. a) Logarithmic phase, from day 0 to 6, procyclic promastigotes predominate, they are larger, viable, metabolically active and have a high replication rate; b) stationary phase, from day 7 to 10, metacyclic promastigotes are abundant, they are thin and elongated, there is a proportion of the parasites with loss of viability; c) death phase, from day 11, there is a decrease in cell density and the remaining parasites present apoptotic characteristics.

**Conclusion.** The characterization of the growth curve of *L. (L.) mexicana* allows to identify easily, quickly, and at low-cost, the time when there is a higher proportion of metacyclic promastigotes in

#### Historial del artículo

Recibido: 30 ene 2022

Aceptado: 10 ago 2022

Disponible en línea: 1 ene 2023

#### Palabras clave

*Leishmania mexicana*, metaciclologénesis, curva de crecimiento

#### Keywords

*Leishmania mexicana*, metacyclogenesis, growth curve

Copyright © 2023 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia: LE Sánchez-Torres, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 Ciudad de México, México. Móvil:5545389714

E-mail:

luviasanchez@hotmail.com; lsanchezt@ipn.mx  
<https://revistabiomedica.mx>.

culture, reducing the variability in the results of *in vitro* and *in vivo* experiments.

## RESUMEN

**Introducción.** La leishmaniasis es un espectro de enfermedades transmitidas por vector causada por protozoarios del género *Leishmania sp.* En México, especies endémicas del complejo *Leishmania (L.) mexicana* son las causantes de leishmaniasis cutánea. Durante el desarrollo del parásito en el vector y en cultivo, se ha descrito el proceso de metacicloogénesis que consiste en cambios morfológicos y bioquímicos para la transformación de promastigotes procíclicos en promastigotes metacíclicos.

**Objetivo.** Caracterizar el proceso de metacicloogénesis en cultivos axénicos de *Leishmania (L.) mexicana*.

**Materiales y métodos.** En cultivos de promastigotes de *L. (L.) mexicana* se evaluaron diferentes parámetros diariamente y a la misma hora durante 15 días para conocer los cambios a través del tiempo. Se analizó la densidad celular, morfología y parámetros de viabilidad celular por microscopía óptica y citometría de flujo.

**Resultados.** Durante el seguimiento de la curva de crecimiento se identificaron 3 etapas; a) fase logarítmica, del día 0 al 6, predominan promastigotes procíclicos, poseen mayor tamaño, son viables, metabólicamente activos y con alta tasa de replicación; b) fase estacionaria, del día 7 al 10, predominan promastigotes metacíclicos, son delgados y alargados, una proporción de los parásitos presentan pérdida de viabilidad; c) fase de declive, a partir del día 11, hay disminución de la densidad celular y los parásitos restantes presentan características apoptóticas.

**Conclusiones.** La caracterización de la curva de crecimiento de *L. mexicana* permite identificar fácil, rápido y a bajo costo, cuando hay mayor proporción y calidad de promastigotes metacíclicos, reduciendo la variabilidad en los resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo*.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una parasitosis considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro

de las enfermedades tropicales desatendidas. Esta enfermedad tiene un gran impacto en la población mundial; en el continente americano, se encuentra presente en al menos 19 países y se registran de 700 mil a 1 millón de casos al año, lo cual corresponde a dos terceras partes del total; Brasil es el país más afectado (1,2). Desafortunadamente México no está exento de esta enfermedad, la mayoría de los casos se presentan en la región centro-sureste del país y son causadas principalmente por especies del complejo *Leishmania (L.) mexicana*; sin embargo, también se han reportado casos por especies del complejo *L. (V.) braziliensis* y la especie *L. (L.) chagasi* (3-6).

Este parásito es transmitido a humanos y a otros animales por vectores del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo o del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y abarca un espectro de enfermedades que pueden englobarse en tres diferentes grupos de manifestaciones clínicas. La leishmaniasis cutánea (LC) con la aparición de úlceras cutáneas que pueden llegar a curarse por sí mismas o que pueden evolucionar a una leishmaniasis mucocutánea (LMC) caracterizada por una infección invasiva que ocasiona la destrucción de la mucosa nasofaríngea, y por último la leishmaniasis visceral (LV) con una elevada tasa de mortalidad y que es causada por la diseminación del parásito afectando principalmente al bazo e hígado (7,8). El patrón de desarrollo de la manifestación clínica es dependiente de la especie de *Leishmania* involucrada, así como del sistema inmunológico del hospedero pudiendo tener consecuencias importantes como la mutilación, discapacidad e incluso la muerte (7). En México, la LC es la que se presenta en la mayoría de los casos (3).

*Leishmania spp.* presenta dos diferentes estadios básicos durante su ciclo de vida. El promastigote localizado extracelularmente en el hospedero invertebrado, mientras que el segundo corresponde a la fase intracelular o amastigote, los cuales se encuentran infectando diferentes células del sistema inmunológico dentro del hospedero vertebrado. El promastigote se multiplica en el tracto digestivo del vector, para posteriormente ser transmitido al mamífero a través de la regurgitación del vector

durante su alimentación (9). Morfológicamente se caracteriza por ser fusiforme de 12 a 20  $\mu\text{m}$  de largo, con un núcleo central y un flagelo anteronuclear que nace del cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto (10). Tras el depósito de los promastigotes en la dermis del mamífero, éstos son fagocitados por diferentes células inmunológicas como los neutrófilos, macrófagos o células dendríticas. Durante este proceso ocurre la formación del fagolisosoma, sin embargo, el parásito es capaz de evadir su destrucción en esta estructura celular; así, luego de pasar por una serie de cambios morfológicos, los promastigotes se convierten en amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria (11). Esta fase del parásito tiene forma esférica con un diámetro de 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$ , con el flagelo internalizado, tiene un núcleo excéntrico y un cinetoplasto que consta de un blefaroplasto y cuerpo basal, de donde nace un rizoplasto que se convierte en el flagelo del promastigote (10).

En el tracto digestivo del vector, se han descrito diferentes formas del parásito que implican cambios morfológicos y bioquímicos, a este proceso se le conoce como metaciclologénesis. Estas modificaciones favorecen la transformación de los promastigotes no infectivos (procíclicos) en promastigotes infectivos (metacíclicos) permitiéndoles sobrevivir a las adecuaciones del microambiente tras localizarse en el hospedero mamífero; este proceso también se ha demostrado en cultivos axénicos. Morfológicamente los promastigotes procíclicos son alargados y con un flagelo más corto que los promastigotes metacíclicos, los cuales son de menor tamaño y más delgados; los primeros se multiplican de manera logarítmica, mientras que los segundos no son replicativos. Este proceso de metaciclologénesis es vital en el parásito ya que le permite adquirir la capacidad infectiva (12-15), de ahí la importancia de poder identificar esta fase en los cultivos axénicos y poder utilizarlos de manera estandarizada en estudios de infección *in vitro* e *in vivo*, que permitan entre otras cosas, estudiar la respuesta inmune del hospedador, los mecanismos de evasión del parásito y la evaluación de posibles fármacos contra esta enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de la cepa de *Leishmania (L.) mexicana*

Se utilizaron promastigotes de *L. (L.) mexicana* (ATCC MNYC-BZ/62/M379) mantenidos en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) inactivado y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL, In vitro S. A.). Los cultivos se incubaron a 27°C en oscuridad.

### Curva de crecimiento de promastigotes de *L. (L.) mexicana*

A partir de un cultivo de promastigotes de *L. (L.) mexicana* en fase estacionaria se realizó la resiembra de  $0.2 \times 10^6$  parásitos/mL en medio RPMI suplementado. El día de la resiembra se consideró como día cero. A partir del día 1 y hasta el día 15, se realizaron conteos diarios, siempre a la misma hora, utilizando una cámara de Neubauer.

### Análisis morfológico

Cada 24 horas se tomó una alícuota del cultivo, los parásitos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) y colocados en un portaobjetos utilizando una citocentrífuga (LaboFuge 400, Thermo Scientific) a 3000 rpm durante 3 min; una vez secas, las muestras se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa 1:10 durante 30 min. Los frotis se observaron en un microscopio óptico (Primo Star, Carl Zeiss) a 100x y se capturaron imágenes representativas con una cámara AxioCam ERc 5s, las cuales fueron analizadas en el software ZEN 2011(16).

### Caracterización de la curva de crecimiento por citometría de flujo

Diariamente se tomaron muestras de los promastigotes y se evaluaron las modificaciones que el parásito presentó a través del tiempo en tamaño y complejidad interna, potencial de membrana mitocondrial e integridad de la membrana plasmática haciendo uso de la citometría de flujo. La adquisición de las muestras se llevó a cabo en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA), se registraron 10,000 eventos de cada muestra y se analizaron en el software CellQuest Pro versión 6.1 (Becton Dickinson).

### a) Cambios en tamaño y complejidad interna

Una vez lavados y resuspendidos en PBS, los parásitos se adquirieron en el citómetro de flujo. Los cambios morfológicos fueron analizados en una gráfica de puntos (dot-plot) de tamaño contra complejidad interna, donde se registraron los patrones de dispersión de la luz frontal (FSC, para tamaño) y lateral (SSC, complejidad) generados por los parásitos (16).

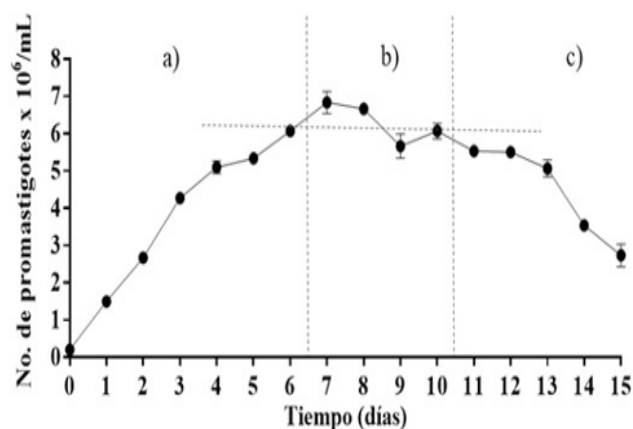
### b) Potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_m$ ) e integridad de membrana plasmática

Los promastigotes se tiñeron con 20  $\mu$ L de Rhodamina 123 (Rho123, 10  $\mu$ g/mL; Sigma), se incubaron durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS y se resuspendieron en 300 $\mu$ L del mismo buffer. Posteriormente, se adicionaron 10  $\mu$ L de yoduro de propidio (PI, 20 $\mu$ g/mL; Sigma), y se dejaron incubar a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 10 min. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo; la integridad de membrana plasmática (exclusión del PI) y el potencial de membrana mitocondrial (retención de la Rho 123) fueron analizadas por separado y simultáneamente mediante un análisis monoparamétrico y un análisis biparamétrico respectivamente (16).

## RESULTADOS

### Curva de crecimiento de *L. (L.) mexicana*

En la figura 1 se muestra la curva de crecimiento obtenida al comparar la concentración celular con respecto a los días de cultivo. En la curva se identificaron tres fases importantes: a) *fase logarítmica o de crecimiento exponencial*, la cual se presenta desde el inicio del cultivo hasta el sexto día; durante esta etapa la densidad celular se incrementó con respecto al tiempo de cultivo; b) *fase estacionaria*, que va del séptimo al décimo día y en la cual, el número de parásitos prácticamente no se modificó y c) *fase de declive*, que inicia a partir del onceavo día, y en la que hay una disminución paulatina del número de parásitos.



**Figura 1.** Curva de crecimiento in vitro de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*. A partir de un inóculo inicial de  $0.2 \times 10^6$  promastigotes/mL, se realizaron conteos diarios de promastigotes viables durante 15 días en cámara de Neubauer. a) Fase logarítmica, b) fase estacionaria, c) fase descendente/declive. Los resultados graficados representan el promedio  $\pm$  ds de tres experimentos independientes.

### Caracterización de la curva de crecimiento de promastigotes *L. (L.) mexicana*

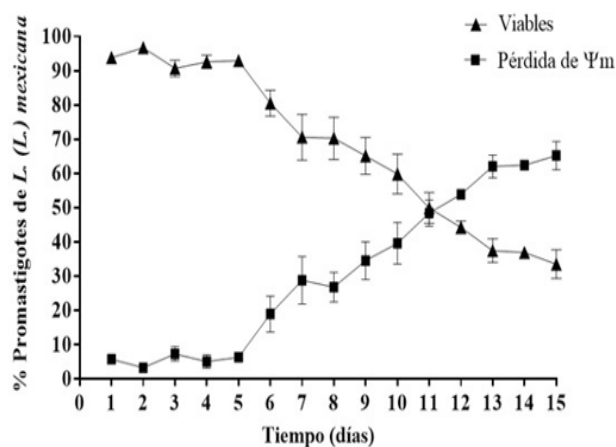
Se realizaron análisis morfológicos, de función mitocondrial, así como de integridad de membrana celular de los promastigotes de *L. (L.) mexicana*. En la tabla 1, se muestra una imagen representativa de cada uno de los parámetros evaluados durante los diferentes días de incubación y que se describen a continuación.

En el análisis morfológico (tabla 1, columna a) se observó que del primero al sexto día de cultivo predominaron los parásitos anchos, con el extremo posterior redondeado y con un flagelo relativamente corto. En la fase estacionaria (días 7-10), la morfología de los parásitos fue más uniforme, tienen forma alargada, son afilados y el flagelo es más largo que el cuerpo de parásito. A partir del décimo día y más claramente a partir del onceavo día, se observó la presencia de células redondeadas, que adquirieron una tinción más tenue y sus organelos estaban menos definidos. En los días 13 y 14 de cultivo, fue evidente la disminución de la densidad celular que correlaciona con los datos de la figura

1, y los pocos parásitos que se aprecian, muestran una estructura celular dañada. Estas observaciones correlacionan con el análisis citométrico presentado (tabla 1, columna b) que muestra los cambios en el tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC) de los parásitos durante los 14 días de seguimiento. En el primer día de cultivo, la mayor parte de los promastigotes se detectan como células grandes ( $FSC^{high}$ ; identificados con  $\blacktriangledown$ ) y con una complejidad interna intermedia. A partir del segundo día y hasta el final del cultivo, la población celular se desplazó de manera paulatina a un valor menor en la escala de FSC que implica una reducción del tamaño celular ( $FSC^{med}$ , marcada con  $\blacktriangledown$ ). Del segundo día y hasta el quinto día, se aprecia un núcleo poblacional celular principal, el cual corresponde a promastigotes en la fase logarítmica. En el séptimo día se aprecia una subpoblación aún de menor tamaño en el vértice de la gráfica que fue aumentando progresivamente ( $FSC^{low}$ , señalada con  $\blacktriangledown$ ), este periodo corresponde a la fase estacionaria en la que se mencionó previamente, que no hubo cambios importantes en la densidad celular, pero sí en la morfología de los promastigotes. En la etapa de declive, la cantidad de promastigotes con un tamaño muy pequeño se incrementó de manera progresiva hasta convertirse en la población mayoritaria en la etapa final de la curva de crecimiento.

El potencial de membrana mitocondrial (tabla 1, columna c) es un parámetro que nos permite evaluar de manera general el funcionamiento celular. En los primeros días de cultivo (del día 1 al 4), la mayoría de los promastigotes presentaron un potencial de membrana mitocondrial alto ( $Rho123^{high}$ , identificados con  $\blacktriangledown$ ), sin embargo, este porcentaje disminuyó conforme avanzó el tiempo; a partir del quinto día de cultivo, se apreció una población de parásitos que da una señal de fluorescencia a la izquierda contigua de la población principal ( $Rho123^{med}$ , marcados con  $\blacktriangledown$ ), la cual representa a promastigotes con un potencial de membrana mitocondrial menor a lo normal. Como se observa en la columna c, es a partir del día siete cuando el nivel de tinción con Rho123 indica que un porcentaje creciente de los parásitos del cultivo presentan una

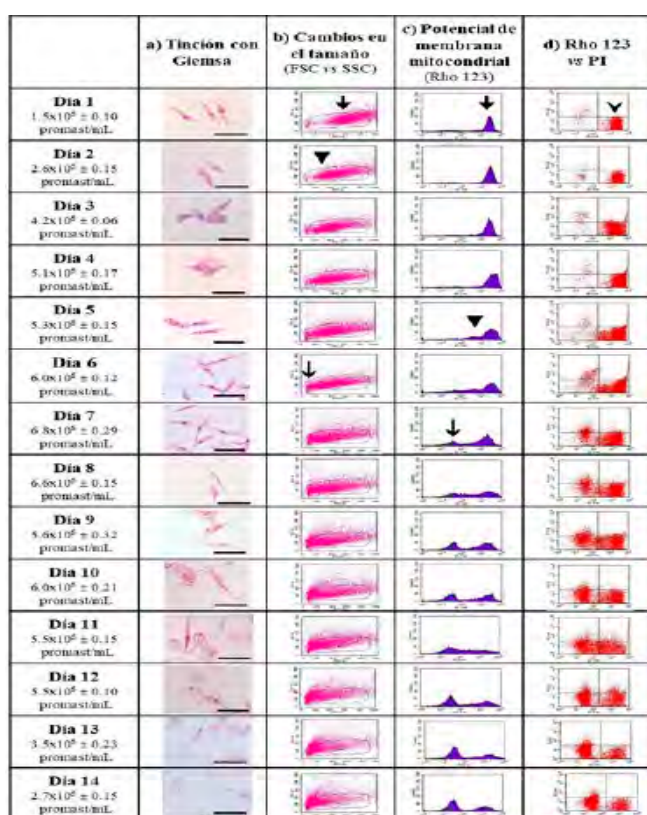
pérdida total del potencial de membrana mitocondrial ( $Rho123^{low}$ , señalados con  $\blacktriangledown$ ), evento directamente relacionado con la activación de un mecanismo de muerte irreversible en los parásitos; dicha proporción es más alta en la fase de declive (a partir del día 11 de cultivo) y concuerda con el análisis morfológico descrito anteriormente en el que se señaló una disminución en el tamaño de las leishmanias (tabla 1, columna a) y con la baja densidad celular presente. De manera paralela, se evaluó la integridad de la membrana plasmática de los promastigotes durante la curva de crecimiento (tabla 1, columna d), lo cual permitió cuantificar el porcentaje de promastigotes con potencial de membrana mitocondrial normal y membrana celular íntegra (cuadrante inferior derecho de los diagramas de puntos, señalado con  $\blacktriangledown$ ) a lo largo del cultivo, ambos son parámetros presentes en parásitos viables. Al cuantificar estos dos eventos, se observó que a partir del día 6 de cultivo, el porcentaje de promastigotes que han perdido potencial de membrana mitocondrial aumenta conforme avanzan los días, y que esto va de la mano con la disminución del porcentaje de parásitos viables (figura 2).



**Figura 2.** Porcentaje de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* viables o con pérdida de potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) durante el seguimiento de la curva de crecimiento. El porcentaje de promastigotes con pérdida de  $\Psi_m$  corresponde a la población de promastigotes Rho 123 negativos. El porcentaje de parásitos viables se cuantificó considerando los promastigotes Rho 123 positivos y PI negativos. Se grafica el promedio del porcentaje de promastigotes para cada caso  $\pm$  ds de tres experimentos independientes.

**Tabla 1. Caracterización de la curva de crecimiento de promastigotes de *L. (L.) mexicana*.**

Diariamente se tomó una muestra de cada cultivo para determinar la densidad celular y caracterizar diversos parámetros: a) morfología celular (la barra equivale a 20  $\mu\text{m}$ ); b) modificaciones en tamaño y complejidad interna (FSC vs SSC); c) el potencial de membrana mitocondrial ( $\psi_m$ , tinción con Rho 123); d) potencial de membrana mitocondrial e integridad de membrana plasmática (Rho 123 vs PI). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes



El análisis de los datos en conjunto indica que, en la fase logarítmica, la mayor parte de los promastigotes tienen un mayor tamaño, están viables, metabólicamente activos y con alta tasa de replicación. En la fase estacionaria aparecen formas más delgadas y alargadas con menor volumen, la mayoría exhiben membrana plasmática íntegra y una proporción de los parásitos presentan pérdida del potencial de membrana mitocondrial; el análisis biparamétrico (Rho 123 vs PI) muestra que esta población tiene características de promastigotes

apoptóticos, por lo tanto, en esta fase hay una mezcla de promastigotes viables y en proceso de muerte apoptótica. En la etapa final o de declive de la curva de crecimiento, hay disminución en la densidad celular debido a la muerte de los parásitos, y la mayor parte de la población que queda aún en los cultivos, presenta características de parásitos apoptóticos.

## DISCUSIÓN

En 1989, Sacks realiza los primeros reportes que evidencian el proceso de metaciclologénesis en *Leishmania sp.* tanto en el vector como en cultivo *in vitro*, y menciona que los promastigotes presentan una serie de cambios secuenciales para pasar de un estado no infectivo a uno infectivo (17). Por otro lado, los primeros reportes con *L. mexicana* surgen en 1993 por Bates y colaboradores, al replicar el ciclo de vida de esta especie *in vitro*, describiendo esta secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos al modificar las condiciones de pH y temperatura del cultivo favoreciendo la transformación del parásito a promastigotes (18,19).

Se ha definido que las formas procíclicas son más grandes, con un flagelo corto y una alta tasa de multiplicación, en cambio los parásitos metacíclicos son más pequeños y delgados, con un flagelo largo; en algunas especies como *L. braziliensis* el largo del flagelo es dos veces el largo del cuerpo del parásito (18, 20, 21). Además, están involucrados una serie de moléculas de superficie que son determinantes para conferir la capacidad infectiva a los promastigotes metacíclicos; dos de las más estudiadas son la lipofosfoglicana (LPG) y la glicoproteína gp63, que recubren al promastigote metacíclico. Estas son clave en la evasión de la respuesta inmunológica al conferirle resistencia a la lisis mediada por complemento y a la destrucción por el fagolisosoma en el interior del macrófago (22). Esta capacidad infectiva en los promastigotes metacíclicos también ha sido demostrada en *L. major* de manera *in vitro* con macrófagos peritoneales e *in vivo* (23).

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos que en el cultivo de promastigotes de *L. (L.) mexicana* realizado en las condiciones descritas, la

fase logarítmica (días 0-6) corresponde a la presencia de promastigotes procíclicos; la fase estacionaria (días 7-10) a promastigotes metacíclicos, y a partir del onceavo día inicia la fase de declive con un porcentaje alto de parásitos con disminuida viabilidad. La identificación del inicio y duración de la fase estacionaria es de vital importancia para establecer protocolos estandarizados que permitan utilizar de manera sistematizada parásitos en la misma fase para estudios *in vitro* e *in vivo*, como aquellos enfocados al estudio de los mecanismos de infección, de respuesta inmune, de evasión, así como para la evaluación de la actividad leishmanicida de diferentes moléculas sobre esta fase infectiva, así mismo, se puede realizar la determinación de la capacidad que tiene esta etapa para infectar macrófagos analizando su posterior conversión a amastigotes o al realizar la infección en ratones.

Las diferencias morfológicas observadas en este trabajo entre promastigotes procíclicos y metacíclicos, se vieron reflejados en los distintos patrones de dispersión de la luz mostrados en el análisis por citometría de flujo; los promastigotes metacíclicos al ser de menor volumen con respecto a los procíclicos, la dispersión de la luz frontal es baja, en cambio las formas procíclicas muestran una alta dispersión frontal de la luz. De acuerdo a lo anterior se puede identificar y cuantificar la población de promastigotes metacíclicos dentro de una población total de promastigotes sin necesidad de purificar o realizar una tinción fluorescente, lo cual reduce tiempo y costos (24), favoreciendo la homogeneidad en la fase de los promastigotes que se usan en experimentos posteriores tanto *in vitro* como *in vivo* y reduciendo la variabilidad de los resultados.

Por otra parte, también es importante tener en cuenta que las células vivas generan un patrón de dispersión de la luz diferente a las células muertas, donde estas últimas al ser de menor tamaño debido al encogimiento o lisis celular, tienen un valor de dispersión frontal menor con respecto a las células vivas (25). Al realizar un seguimiento de los promastigotes durante el cultivo, es importante tener en cuenta la viabilidad celular para poder definir que

las poblaciones pequeñas (FSCmed-low) en realidad corresponden a promastigotes metacíclicos viables y no a parásitos muertos o restos celulares; para esto se incluyó en la tinción con yoduro de propidio (PI) que permite hacer esta distinción (26).

Durante la metaciclologénesis, es importante además caracterizar las modificaciones que pueden ocurrir en diferentes organelos como las mitocondrias y que son de vital importancia para el parásito al proveerle de energía. En el caso de los tripanosomátidos, éstos se caracterizan por tener una sola mitocondria de gran tamaño (mitocondrión) (27). Al ser la citometría de flujo una herramienta multiparamétrica, se pueden evaluar varios parámetros simultáneamente, por lo cual durante el seguimiento de la curva de crecimiento además de evaluar los cambios en la morfología y la viabilidad, se evaluó la pérdida de potencial de membrana mitocondrial con el fluorocromo lipofílico catiónico Rho 123. Las células viables poseen un alto potencial de membrana mitocondrial y tienen la capacidad de retener el fluorocromo en el interior de la mitocondria reflejando una alta fluorescencia. En las células en etapas tempranas de apoptosis el potencial de membrana mitocondrial decae, por lo cual disminuye la capacidad de retención del fluorocromo, mientras que en las células apoptóticas tardías e incluso en las necróticas la actividad mitocondrial es nula. Con base en lo anterior, el análisis simultáneo de viabilidad y pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Rho 123 vs PI) permite la distinción entre células viables, apoptótica y apoptóticas tardías y/o necróticas. Es importante resaltar que los procesos de muerte celular programada como la apoptosis, ya ha sido demostrado que también ocurren en organismos unicelulares como *Leishmania sp.* y no es un proceso exclusivo de organismo pluricelulares (28).

La pérdida de potencial de membrana mitocondrial se ha relacionado con apoptosis en eucariontes, sin embargo se conoce muy poco del impacto en protozoarios (29). Lee y colaboradores, llevaron a cabo la evaluación de una serie de marcadores de muerte celular en un cultivo de promastigotes de *L. donovani* a diferentes días de incubación; en la

fase estacionaria detectaron fragmentación del ADN con patrón de escalera y pérdida de potencial de membrana mitocondrial, concluyendo que en *L. donovani* se presenta un proceso de muerte celular programada cuando las células entran en fase estacionaria del cultivo (30), siendo esto congruente con nuestros resultados para *L. mexicana*.

Por otra parte es importante señalar que los promastigotes metacíclicos presentan parámetros bioquímicos característicos de células apoptóticas, lo que explica, al menos en parte, su alta capacidad de infectividad; diversas investigaciones se han centrado en que la muerte celular por apoptosis en *Leishmania sp.* es un mecanismo “altruista” de algunos promastigotes al momento de infectar a un mamífero para promover la sobrevivencia del resto de la población como amastigotes, debido a que la apoptosis, al ser un proceso de muerte que no emite señales de alerta, no favorece la activación del sistema inmunológico (14,31,32). Este proceso ha sido catalogado como una estrategia inmunomoduladora que le resulta esencial para el establecimiento de la infección y garantizar la supervivencia del parásito en el mamífero (33).

## CONCLUSIÓN

La caracterización de la curva de crecimiento de *L. (L.) mexicana* analizando su densidad celular, los cambios morfológicos y parámetros de viabilidad celular por citometría de flujo permite identificar de manera fácil, rápida y a bajo costo, el momento en el que la mayor proporción de parásitos en un cultivo axénico presenta la fase de promastigotes metacíclicos, lo cual es importante para la realización de estudios *in vitro* e *in vivo*, reduciendo así la variabilidad en los resultados ocasionados por la presencia de diversas proporciones de promastigotes procíclicos/metacíclicos en cada experimento. Es importante resaltar que este análisis es particular de cada especie, por lo que es necesario realizarlo para aquella con la que se desee trabajar.

## AGRADECIMIENTOS

KFCV cuenta con beca posdoctoral otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

(CONACyT, 252867), GCR cuenta con beca doctoral otorgada por CONACyT, (858657) y por el programa BEIFI-IPN (proyecto 20210048). LEST es becaria de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas-IPN (COFAA-IPN) y del programa de Estímulo al Desempeño de los Investigadores-IPN (EDI-IPN).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tiene ningún conflicto de intereses

## REFERENCIAS

1. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet. 2018 Sep; 392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
2. Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, et al. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. Sci Data. 2020 Apr ;7 (1):110. doi: 10.1038/s41597-020-0451-5.
3. Instituto De Diagnóstico Y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos Para La Vigilancia Por Laboratorio De La Leishmaniasis, INDRE. México: Secretaría De Salud; 2019
4. Pan American Health Organization. LEISHMANIASIS Epidemiological Report of the Americas. Report No. 10. PAHO; 2021
5. Monroy-Ostria A, Sanchez-Tejeda G. Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of *Leishmania* species in Mexico. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002 Apr; 96: S101-S104. doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90059-3
6. Monroy-Ostria A, Sanchez-Tejeda G. Survey of cutaneous leishmaniasis in Mexico: *Leishmania* species, clinical expressions and risk factors. In: The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. London, United Kingdom: InTech; 2017. P. 153-165. doi.org/10.5772/65501,
7. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol. 2016 Sep; 16(9):581-92. doi: 10.1038/nri.2016.72.
8. Von Stebut E. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges. 2015 Mar; 13(3):191-200; quiz 201. (German). doi: 10.1111/ddg.12595
9. Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Dey R, Kissinger R, Valenzuela JG, Oliveira F, et al. Leishmaniasis: the act of transmission. Trends Parasitol. 2021 Nov; 37(11):976-987. doi: 10.1016/j.pt.2021.07.003.
10. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. PLoS



- Pathog. 2013;9(10):e1003594. doi: 10.1371/journal.ppat.1003594.
11. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul; 9(8):604-15. doi: 10.1038/nrmicro2608.
  12. Amiri-Dashatan N, Rezaei-Tavirani M, Zali H, Koushki M, Ahmadi N. Quantitative proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in *Leishmania major* metacyclogenesis. *Microb Pathog*. 2020 Dec; 149:104557. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104557.
  13. Bilbao-Ramos P, Sifontes-Rodríguez S, Dea-Ayuela MA, Bolás-Fernández F. A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotes. *J Microbiol Methods*. 2012 Apr; 89(1):8-11. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.013. Epub 2012 Jan 28. PMID: 22310031.
  14. Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS One*. 2009 May; 4(5):e5733. doi: 10.1371/journal.pone.0005733
  15. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol*. 2011 Feb; 79(3):647-62. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x.
  16. Chacón-Vargas KF, Andrade-Ochoa S, Nogueira-Torres B, Juárez-Ramírez DC, Lara-Ramírez EE, Mondragón-Flores R, et al. Isopropyl quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives induce regulated necrosis-like cell death on *Leishmania (Leishmania) mexicana*. *Parasitol Res*. 2018 Jan; 117(1):45-58. doi: 10.1007/s00436-017-5635-3.
  17. Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*. 1989 Jul; 69(1):100-3. doi: 10.1016/0014-4894(89)90176-8.
  18. Bates PA. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*. 1994 Jan; 108 (Pt 1):1-9. doi: 10.1017/s0031182000078458.
  19. Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Exp Parasitol*. 1993 Jun; 76(4):412-23. doi: 10.1006/expr.1993.1050.
  20. da Silva IA Jr, Morato CI, Quixabeira VB, Pereira LI, Dorta ML, de Oliveira MA, et al. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *Biomed Res Int*. 2015;2015:393049. doi: 10.1155/2015/393049.
  21. Zakai HA, Chance ML, Bates PA. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology*. 1998 Apr; 116(Pt 4):305-9. doi: 10.1017/s0031182097002382.
  22. Muskus CE, Marín Villa M. Metaciclo­gé­ne­sis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomedica*. 2002 Jun;22(2):167-77.
  23. Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985 May; 34(3):456-9. doi: 10.4269/ajtmh.1985.34.456.
  24. Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira ME. Flow cytometric assessment of *Leishmania spp* metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Exp Parasitol*. 2005 May; 110(1):39-47. doi: 10.1016/j.exppara.2005.01.004.
  25. Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Lüder CG, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors*. 2010 Nov; 3:104. doi: 10.1186/1756-3305-3-104.
  26. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol*. 2011;103:55-98. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8.
  27. de Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (*Apicomplexa* and *Kinetoplastida*). *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Oct; 41(10):2069-80. doi: 10.1016/j.biocel.2009.04.007.
  28. Basmacıyan L, Casanova M. Cell death in *Leishmania*. *Parasite*. 2019; 26:71. doi: 10.1051/parasite/2019071.
  29. Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol*. 2013 Jan; 11(1):58-66. doi: 10.1038/nrmicro2929.
  30. Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ*. 2002 Jan; 9(1):53-64. doi: 10.1038/sj.cdd.4400952.
  31. Wanderley JL, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira ME, Barcinski MA. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Jun; 38(6):807-12. doi: 10.1590/s0100-879x2005000600001.
  32. El-Hani CN, Borges VM, Wanderley JL, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Jul; 2:96. doi: 10.3389/fcimb.2012.00096.
  33. Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol*. 2014 Oct; 5:480. doi: 10.3389/fimmu.2014.00480.