



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja
Facultad de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

**Conversión *in vitro* de promastigotes de *Leishmania naiffi* en
amastigotes**

Trabajo de Integración Curricular,
previo a la obtención del título de
Licenciado en Laboratorio Clínico

AUTOR:

Claudio Manuel Álvarez Jiménez

DIRECTOR:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Loja –Ecuador

2023

Certificación

Loja, 20 de julio de 2023

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana

DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Conversión *in vitro* de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes**, previo a la obtención del título de **Licenciado en Laboratorio Clínico**, de la autoría del estudiante **Claudio Manuel Alvarez Jimenez**, con cédula de identidad Nro. **1150647558**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja y ha sido culminado y aprobado. Por lo tanto, otorgo mi autorización para la presentación del mismo en su debida sustentación y defensa.



Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana

DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Claudio Manuel Álvarez Jiménez**, declaro ser autor del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.

Firma: 

Cédula de identidad: 1150647558

Fecha: 05 de diciembre de 2023

Correo electrónico: claudio.alvarez@unl.edu.ec

Teléfono: 0994034175

Carta de autorización

Yo, **Claudio Manuel Álvarez Jiménez**, declaro ser autor del Trabajo de Integración Curricular denominado **Conversión *in vitro* de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes**, como requisito para optar el título de **Licenciado en Laboratorio Clínico**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los cinco días del mes de diciembre de dos mil veintitrés.

Firma: 

Autor: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Cédula: 1150647558

Dirección: Ciudadela 8 de diciembre, entre Francisco Valdivieso y Carlos Erreyes

Correo electrónico: claudio.alvarez@unl.edu.ec

Celular: 0994034175

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del trabajo de integración curricular

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Dedicatoria

Al culminar este trabajo de integración curricular, quiero agradecer en primer lugar a Dios que me ha guiado para salir adelante, a mi familia y a todas las personas que de una u otra manera me supieron brindar su apoyo para culminar este proyecto de investigación.

Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de Loja quien me abrió las puertas durante todo este tiempo de formación académica de igual manera a todos los docentes de la carrera de laboratorio clínico por impartirme sus conocimientos.

De manera especial agradezco al Dr. Luis Morocho Yaguana, quien siempre estuvo ahí brindándome su apoyo y conocimiento para poder desarrollar este proyecto de investigación.

De igual manera agradezco a la Lic. Diana Ramón por su ayuda en el Laboratorio del CDM de la facultad y también a la Bq. María Esther Romero encargada del laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Loja (INSPI).

Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Índice de contenido

| | |
|---------------------------------------------|------|
| Portada | i |
| Certificación | ii |
| Autoría | iii |
| Carta de autorización | iv |
| Dedicatoria | v |
| Agradecimiento | vi |
| Índice de contenido | vii |
| Índice de tablas | vii |
| Índice de anexos | viii |
| 1. Título | 1 |
| 2. Resumen | 2 |
| Abstract..... | 3 |
| 3. Introducción | 4 |
| 4. Marco Teórico | 6 |
| 4.1. Definiciones | 6 |
| 4.1.1. Leishmaniasis | 6 |
| 4.1.2. Agente etiológico | 6 |
| 4.1.3. Vector | 6 |
| 4.1.4. Ciclo de vida..... | 7 |
| 4.1.5. Taxonomía de leishmania..... | 8 |
| 4.1.6 Reservorios..... | 8 |
| 4.2. Formas clínicas de leishmaniasis | 9 |
| 4.2.1. Leishmaniasis cutánea..... | 9 |
| 4.2.2. Leishmaniasis mucocutanea | 9 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.3. Leishmaniasis visceral..... | 9 |
| 4.3. Diagnóstico de laboratorio | 10 |
| 4.3.1. Demostración de los amastigotes en el frotis y/o biopsia | 10 |
| 4.3.2 PCR (reacción en cadena de la polimerasa) | 11 |
| 4.3.3. Prueba intradérmica de Montenegro | 11 |
| 4.3.4 Pruebas serológicas | 11 |
| 4.4. Los cultivos in vitro..... | 11 |
| 4.4.1 Condiciones del cultivo..... | 12 |
| 4.4.2 pH..... | 13 |
| 4.4.3. Temperatura | 13 |
| 4.5. Características morfológicas de promastigotes y amastigotes | 14 |
| 4.6. Tratamiento | 14 |
| 5. Metodología | 16 |
| 5.7.1. Fase preanalítica | 16 |
| 5.7.2. Fase analítica | 17 |
| 5.7.3. Características morfológicas de promastigotes y amastigotes..... | 17 |
| 6. Resultados | 19 |
| 7. Discusión | 21 |
| 8. Conclusiones | 22 |
| 9. Recomendaciones | 23 |
| 10. Bibliografía | 24 |
| 11. Anexos | 29 |

Índice de tablas

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Conversión de amastigotes a 32 0C y 10% de SFB | 19 |
| Tabla 2. Conversión de amastigotes a 34 °C y 10% de SFB..... | 19 |
| Tabla 3. Conversión de amastigotes a 35 °C y 10% de SFB..... | 20 |
| Tabla 4. Conversión de amastigotes a 37 0C y 10% de SFB | 20 |

Índice de anexos

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1. Oficio de pertinencia | 29 |
| Anexo 2. Oficio de autorización para el uso del laboratorio | 30 |
| Anexo 3. Protocolo para la preparación del medio de cultivo (NNN)..... | 31 |
| Anexo 4. Protocolo para preparación del medio de cultivo Drosophila | 33 |
| Anexo 5. Protocolo para ajuste de pH..... | 35 |
| Anexo 6. Protocolo para la conversión de promastigotes a amastigotes | 37 |
| Anexo 7. Protocolo para diluciones | 39 |
| Anexo 8. Protocolo para recuento en la cámara de Neubauer | 40 |
| Anexo 11. Difusión de resultados | 43 |
| Anexo 12. Evidencias fotográficas | 47 |
| Anexo 13. Certificación de traducción del Abstract | 48 |

1. Título

Conversión *in vitro* de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes

2. Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que causa, en el ser humano, un conjunto de síndromes clínicos que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras. Es un importante problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica, presente en la mayoría de las provincias del Ecuador. El presente trabajo se propuso convertir cultivos de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes mediante la variación de la temperatura y pH. La conversión se ensayó en medio Schneider Drosophila suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) y gentamicina; el pH se ajustó con ácido clorhídrico al 10%.

Después de 6 días de cultivo hubo una conversión del 80%. Los resultados evidencian que es posible convertir promastigotes en amastigotes, lo cual ayudaría en el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis con el desarrollo de vacunas y fármacos, y de esa manera desarrollar estrategias de control y eliminación contra este parásito y, finalmente, se realizó la difusión de los resultados a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

Palabras clave: Promastigotes, amastigotes, pH, temperatura, leishmania

Abstract

Leishmaniasis is a zoonotic disease that causes a set of clinical syndromes in humans that can affect the skin, mucous membranes, and viscera. It is an important public health problem due to its wide geographical distribution and cases have been reported in most of the provinces of Ecuador. In the present work, I set out to convert cultures of *Leishmania naiffi* promastigotes into amastigotes by varying temperature and pH, liquid Schneider *Drosophila* supplemented with Fetal Bovine Serum, and gentamicin was prepared, 10% hydrochloric acid solution was added to adjust different pH, after 6 days of culture there was a successful conversion. The results show that it is possible to convert promastigotes into amastigotes, which would serve in subsequent biological and immunological studies to investigate the mechanisms by which this parasite intervenes in pathogenesis, as well as the immune responses generated after infection, and thus develop control and elimination strategies against this parasite and finally, the dissemination of the results to the students and teachers of the Clinical Laboratory career was carried out.

Keywords: Promastigotes, amastigotes, pH, temperature, leishmania

3. Introducción

Las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas que causan en el ser humano un conjunto de síndromes clínicos que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* y se transmiten a los animales y humanos a través de insectos de la familia *Psychodidae* (OPS, 2019).

Las leishmaniasis están distribuidas en todos los continentes, son endémicas en 98 países, y se estima que aproximadamente 350 millones de individuos están en riesgo de adquirirlas (Zambrano, 2014). Se desconoce la incidencia y prevalencia real de la enfermedad, porque solo en 52 de los países endémicos, es una enfermedad que su notificación es obligatoria. Se calcula una prevalencia mundial de 20 millones de casos, y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5 - 2 millones de nuevos casos para las leishmaniasis cutáneas, y 500.000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral (Zambrano, 2014).

La leishmaniasis en el Ecuador es un importante problema de salud pública debido a su amplia distribución geográfica, sobre todo en las áreas rurales, cercanas a bosques o en lugares remotos del país por el difícil acceso a transporte y medicación principalmente en las provincias amazónicas, razón por la cual se volvió una de las patologías de notificación obligatoria desde el año 2005 (Hashiguchi et al., 2017).

En el año 2021 se han notificado 1.251 casos: 1217 son de tipo cutáneo; 34 casos de tipo mucocutánea, En el año 2022 se han notificado 844 casos: 813 son de *Leishmania* cutánea; 31 casos de *L. mucocutánea*, siendo Morona Santiago la provincia con mayor número de casos con 152. En el mismo año en Loja se notificaron 19 casos de los cuales 15 fueron de leishmaniasis cutánea y 4 de leishmaniasis mucocutánea (Ministerio de Salud Pública, 2022).

El tratamiento es problemático debido a que los medicamentos disponibles requieren de administración repetida, no son efectivos en todos los casos y la mayor parte se asocia con efectos secundarios, por lo que un diagnóstico certero es imprescindible (González et al., 2017).

La dificultad de obtener grandes cantidades de amastigotes, libres de contaminantes de la célula huésped, ha dificultado la investigación de sus propiedades metabólicas, bioquímicas y biológicas, ya que cuando se aíslan amastigotes de vertebrados infectados o de líneas celulares de macrófagos existen la presencia de componentes absorbidos de la célula huésped (Teixeira et al., 2016). Además, un estudio sobre los receptores de macrófagos para *Leishmania* demostraron la presencia de inmunoglobulinas del huésped en la superficie de amastigotes derivados de lesiones, lo que dificultaría especialmente su uso en estudios biológicos e inmunológicos. De igual manera para el aislamiento y crecimiento de promastigotes utilizando

macrófagos aislados de sangre humana, se necesita de un buen equipamiento del laboratorio así como también medios especiales, y los laboriosos procedimientos para la purificación de parásitos intracelulares (Li et al., 2017).

La presente investigación tuvo como objetivo general efectuar la conversión *in vitro* de promastigotes de *L. naiffi* en amastigotes mediante la variación de la temperatura de cultivo y pH del medio y como objetivos específicos se planteó convertir cultivos de promastigotes de *L. naiffi* en amastigotes mediante la variación de la temperatura del cultivo, determinar la conversión de promastigotes en amastigotes en un medio de cultivo líquido mediante la variación el pH del medio.

El presente Trabajo de integración Curricular ayudará en estudios posteriores la investigación de las propiedades metabólicas, bioquímicas y biológicas de amastigotes; realizar estudios biológicos e inmunológicos, detectar las proteínas de membrana, genes que en promastigotes no se los puede detectar (Teixeira et al., 2016).

Por lo tanto, el cultivo *in vitro* de parásitos de leishmania juega un papel importante en el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis y en los estudios de desarrollo de vacunas y fármacos (Li et al., 2017).

4. Marco Teórico

4.1. Definiciones

4.1.1. *Leishmaniasis*

Es una enfermedad crónica, zoonótica y de transmisión vectorial, producida por un protozoo intracelular perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, del género *Leishmania*; comprende alrededor de 22 especies patógenas al hombre, las cuales se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Hailu & Frommel, 2019).

Las presentaciones clínicas de la patología varían de acuerdo con la especie de leishmania, la respuesta inmune del hospedero y el estado evolutivo de la enfermedad se presenta en las formas cutánea, mucosa y visceral (Rojas et al., 2017).

4.1.2. *Agente etiológico*

El parásito es un protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*. Del género *Leishmania* y del cual se han identificado, al menos, 20 especies responsables de las distintas formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad (INS, 2022).

El parásito es digenético, es decir, durante su ciclo de vida se encuentra en dos formas o estadios: una forma promastigote que mide entre 20 y 30 μm , es extracelular y alargada, que posee un flagelo que le permite la movilidad en el intestino de los vectores y otra forma, la amastigote, que mide entre 2 y 5 μm , es redondeada e intracelular, carece de flagelo, y se multiplica en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente macrófagos. Ambas formas del parásito se dividen por fisión binaria y, además, poseen una única mitocondria modificada conocida como kinetoplasto (OPS, 2019).

En las Américas, la forma de promastigote es transmitida a los mamíferos susceptibles, entre ellos los humanos, a través de la picadura de insectos vectores del género *Lutzomyia* (OMS, 2019).

4.1.3. *Vector*

Los flebotomíneos son pequeños dípteros hematófagos de la familia *Psychodidae* de gran importancia en salud pública por su papel como vectores de parásitos del género *Leishmania* y de bacterias del género *Bartonella*. Se caracterizan por la venación del ala y la presencia de densos pelos en las alas y el tórax. Los miembros de la subfamilia *Phlebotominae* predominan en las regiones tropical y subtropical. El grupo está compuesto por 6 géneros, pero en las Américas, *Lutzomyia* es el más importante (Chacón et al., 2023).

La biología de cada una de las diferentes especies de flebotomíneos es única y compleja. Las diferencias entre una especie y otra son notables, sobre todo respecto a los factores relacionados con el período y el desarrollo local de los estadios inmaduros (Urmeneta, 2019).

Los flebotomíneos son insectos con una metamorfosis completa, es decir, pasan por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto, cuya duración respectiva varía según las especies. Los adultos miden menos de 5 mm de longitud, tienen patas largas, alas ampliamente lanceoladas sin venas cruzadas más allá de la base y tórax giboso. Su cuerpo está revestido de pelos largos y finos que le confieren un aspecto hirsuto (Domínguez, 2021).

Estos insectos se encuentran distribuidos por amplias zonas del mundo, de modo que sólo los que viven en áreas tropicales pueden realizar su ciclo vital completo durante todo el año, mientras que los que viven en las regiones subtropicales solo lo pueden realizar durante los meses cálidos. Los hábitats varían desde selva húmeda hasta regiones muy áridas. Su vuelo es corto, silencioso y en pequeños saltos. Las especies del género *Lutzomyia* tienen principalmente actividad crepuscular y nocturna, aunque también pueden estar activas durante el día (Botero & Restrepo, 2019).

4.1.4. Ciclo de vida

Todos los géneros *Leishmania* poseen un ciclo de vida similar, que incluye a insectos de la familia *Psychodidae*, en el nuevo mundo los vectores pertenecen al género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* en el viejo mundo. El vector hembra se infecta al picar un vertebrado y succionar sangre con amastigotes y macrófagos infectados. Su reproducción es por medio de división binaria en diferentes partes del tubo digestivo del vector y se los clasifica en *Hypopyloria* o parte inferior, *Suprapyloria* o superior y *Peripyloria* en ambas partes. En cualquiera de éstas, los amastigotes se alargan y desarrollan un flagelo dando origen a los promastigotes, el vector ya infectado pica a un nuevo vertebrado donde son regurgitados promastigotes metacíclicos, que son los parásitos infectantes. El tiempo que le toma al vector para volverse infectante es de 10 días. En la naturaleza la infección es baja por lo que tienen que picar varias veces para así poder inocular de 10 a 200 parásitos (Botero & Restrepo, 2019).

El desarrollo del ciclo biológico de los parásitos del género *Leishmania* puede ser experimentalmente estudiado *in vivo* e *in vitro* (Acero et al., 2017).

Al momento que penetran los promastigotes en la piel éstos son englobados por las células de Langerhans y otros macrófagos, dentro de los fagosomas se transforman en amastigotes, dentro de estos se reproducen intracelularmente por división binaria hasta que

rompen la célula e invaden a nuevas células hasta causar lesiones ulcerativas por destrucción de tejido (Botero & Restrepo, 2019).

4.1.5. Taxonomía de leishmania

Según Gómez, (2016) se clasifica de la siguiente manera:

- **Reino:** *Protista*.
- **Subreino:** *Protozoo*.
- **Phylum:** *Sarcomastigophora*.
- **Clase:** *Zoomastigophorea*.
- **Orden:** *Kinetoplastida*.
- **Familia:** *Trypanosomatidae*.
- **Género:** *Leishmania*.
- **Subgéneros:** *Leishmania* y *Viannia*

4.1.6 Reservorios

Los reservorios son animales vertebrados que mantienen al parásito en el medio ambiente y por ello dan paso a que los vectores se infecten de ellos y pueda continuar el ciclo de transmisión. Se considera un reservorio principal para cada especie de leishmania en cada foco determinado, pero otros mamíferos de la misma zona pueden resultar también infectados y convertirse en hospederos secundarios o accidentales. Los mamíferos domésticos y selváticos marsupiales, carnívoros, endentados y primates infectados por leishmania pueden o no mostrar signos evidentes de infección. Existen reservorios tanto domésticos como silvestres, pero para algunas especies del parásito el ser humano es el reservorio principal en el viejo mundo. Este es el caso de la leishmaniasis visceral causada por *L. donovani* y cutánea causada por *L. trópica*, ambas del Viejo Mundo (Fabián et al., 2022).

En las Américas, Nuevo Mundo, las leishmaniasis son principalmente zoonosis. Los reservorios identificados incluyen a los marsupiales (*Didelphis spp*), al oso perezoso (*Choloepus spp* y *Bradypus spp*), al vermilingua (*Tamandua tetradactyla*), al zorro (*Cerdocyon thous*) y a los roedores (*Rattus spp*, *Proechimys spp*, *Nectomys spp*, *Oryzomys spp*). El reservorio doméstico más importante de *L. infantum* es el perro. Así es que sólo se considera como reservorios de *Leishmania spp* a los animales que garantizan a la vez la circulación y la manutención de las diferentes especies de leishmania en la naturaleza. Como se ve, el solo hallazgo de un animal infectado por leishmania no puede ser prueba suficiente para incriminarlo como reservorio (Fabián et al., 2022)

En el Ecuador se ha identificado algunos animales que actúan como reservorios; entre ellos oso hormiguero, coatíes, , la rata negra y el perro doméstico. Puede haber más en el resto del continente, porque cualquier mamífero actúa como animal reservorio (Gómez, 2016).

4.2. Formas clínicas de leishmaniasis

Hay tres formas clínicas de leishmaniasis: visceral (la forma más grave de la enfermedad), cutánea (la más común) y mucocutánea. En el Ecuador únicamente se han reportado casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea.

4.2.1. *Leishmaniasis cutánea*

Según la especie de *Leishmania*, se pueden observar úlceras, nódulos lisos, placas planas o lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas. Las lesiones iniciales que aparecen en la piel generalmente son pápulas. Muchas lesiones permanecen localizadas, pero en algunos casos, los parásitos pueden propagarse a través de los vasos linfáticos y producir lesiones secundarias en la piel o, en ocasiones, en la mucosa de otras partes del cuerpo. En los pacientes inmunodeprimidos, es más frecuente y grave; la forma de presentación puede ser atípica, con lesiones nodulares que no siempre afectan a la cara, y mayor abundancia del parásito en las lesiones (Abadías et al., 2021).

Se estima que hasta el 10% de los casos de leishmaniasis cutánea muestran progresión, se vuelven crónicos y exhiben características clínicas más graves (Gurel et al., 2020).

4.2.2. *Leishmaniasis mucocutanea*

Aparece en forma de lesiones ulceradas, que pueden ser desfigurante, conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la laringe. Las lesiones en piel pueden cicatrizar sin necesariamente haber tenido tratamiento y luego pueden recidivar muchos años después, con lesiones en piel o mucosa oral y/o nasal (Franchini et al., 2017).

Es una condición potencialmente mortal y altamente desfigurante debido a la destrucción de mucosa de oro-nasofaringe y cartílago, que afecta ocasionalmente la laringe y conduce a la neumonía por aspiración (Ching et al., 2022).

4.2.3. *Leishmaniasis visceral*

El inicio de la leishmaniasis visceral puede ser agudo. Sin tratamiento, la enfermedad suele ser mortal dentro de los dos años siguientes, como resultado de una infección bacteriana secundaria o anemia grave. Sin embargo, las personas que están infectadas solo pueden desarrollar síntomas años más tarde, cuando se vuelven inmunodeprimidas (Asli et al., 2019).

La presentación clínica generalmente implica fiebre baja a largo plazo, agrandamiento del bazo y el hígado, pérdida de peso, Con el tiempo, puede causar caquexia severa y sangrado debido a trombocitopenia. La leishmaniasis visceral sin tratar en la mayoría los casos finalmente conducen a la muerte (Kumar & Nylén, 2012).

L. Naiffi, *L. mexicana*, *L. braziliensis* asociadas con lesiones cutáneas humanas, se adaptan hasta 35°C *in vitro*, que se correlaciona con la temperatura máxima de la piel humana. Especies viseralizadoras como *L. chagasi* se adaptan a temperaturas más altas de 35-39° C, que se compara con la temperatura de la cavidad abdominal humana.

4.3. Diagnóstico de laboratorio

El espectro clínico de la leishmaniasis es muy amplio y puede confundirse con otras enfermedades, es de gran importancia el diagnóstico temprano. Solo así es posible administrar el tratamiento específico oportunamente y, en la misma medida, controlar la evolución de la enfermedad, aliviar los signos y síntomas, reducir la letalidad de la leishmaniasis visceral y mejorar la calidad de vida de los pacientes; en especial de aquellos que presentan leishmaniasis cutánea o mucocutánea, quienes más que otros están expuestos a un gran estigma social a causa de las secuelas físicas y psicológicas de la enfermedad (Werner, 2013).

El diagnóstico presuntivo se basa, en primer lugar, en las características clínicas de la enfermedad, las más importantes de las cuales son lesión ulcerativa, no dolorosa, con un fondo granulomatoso grueso, con bordes indurados, violáceos y con una duración mayor a cuatro semanas. El segundo aspecto importante es el antecedente epidemiológico (Botero & Restrepo, 2012)

4.3.1. Demostración de los amastigotes en el frotis y/o biopsia

El frotis es el método más común, y hay diferentes procedimientos para tomar la muestra, entre ellos, por raspado con hoja de bisturí, espátula, por aspiración con una aguja hipodérmica o micropipeta. La mejor muestra es aquella rica en linfa y sin sangre, gérmenes o mucus que impiden una buena observación. El método de coloración es el de Giemsa y debe observarse con objetivo de inmersión por 30 minutos (Botero & Restrepo, 2019).

El examen directo puede realizarse de dos maneras: haciendo un raspado del borde interno de la úlcera o haciendo una incisión y raspando el borde activo de la lesión. Si existen dos o más lesiones, debe escogerse para el examen directo la que tenga un menor tiempo de evolución.

Los parásitos se encuentran libres o en el interior de los macrófagos. En las lesiones recientes y no tratadas, el hallazgo de los amastigotes es más frecuente, lo que no ocurre en

lesiones contaminadas o crónicas. Se trata de un método barato, pero de baja sensibilidad porque es afectado por tratamientos previos o sobreinfección bacteriana y requiere de personal entrenado para su lectura (Jaramillo et al., 2018)

Los amastigotes se pueden observar microscópicamente dentro de los macrófagos o fuera de ellos. Son estructuras redondeadas u ovaladas, de 2 a 4 μm de diámetro, con un núcleo y kinetoplasto característicos; el citoplasma se colorea de azul pálido con Giemsa y el kinetoplasto se ve como una barra de color púrpura (Jaramillo et al., 2018)

4.3.2 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Es el método más sensible (>90%); sin embargo, su uso requiere de equipos sofisticados y personal altamente entrenado, por lo que se restringe aun en laboratorios especializados. Además del PCR clásico, se dispone RT-PCR (PCR en tiempo real) (Minaya & Torres, 2015)

4.3.3. Prueba intradérmica de Montenegro

Consiste en la inoculación intra epidérmica de un extracto proteico (concentración 30 mg/ml) de un lisado de promastigotes de leishmania procedentes de un cultivo en masa. Se considera positiva la aparición de una macula-pápula en el punto de inoculación a partir de las 48 horas (diámetro igual o mayor a 5 mm). Es útil cuando no se puede hacer diagnóstico parasitológico porque su correlación con la clínica es buena (la sensibilidad varía entre 85-95% y la especificidad entre 88-93%, dependiendo de la forma clínica); sin embargo, su limitación es la falta de estandarización (Minaya & Torres, 2015)

4.3.4 Pruebas serológicas

La inmunofluorescencia indirecta y ELISA son los métodos más usados para la detección de anticuerpos. Dan reacción cruzada, principalmente con enfermedad de *Chagas* y *L. visceral*. Teniendo en cuenta que las diferentes especies de leishmania varían en forma considerable en cuanto a su capacidad para inducir anticuerpos detectables, en leishmaniasis tegumentaria estas pruebas son poco usadas por limitaciones en la sensibilidad y especificidad (Botero & Restrepo, 2019)

4.4. Los cultivos *in vitro*

El material se obtiene por aspiración o biopsia, el cual debe triturarse antes de la inoculación al medio de cultivo, la obtención de la muestra es más complicada en lesiones nasales. El medio de cultivo es el Novy, Nicolle y McNeal suplementando con sangre desfibrinada de conejo (15%), otros medios son el RPMI o M199, los cultivos deben mantenerse a 23°C y se tornan positivos entre 3-30 días, siendo lo usual de 7 a 15 días (Beatriz, 2019)

Constituyen un método útil en el trabajo de campo, ya que es una técnica auxiliar para el diagnóstico directo, permite el aislamiento del parásito y facilita su detección. En la actualidad aún no existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de leishmania ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. Los medios más utilizados son los medios difásicos de agar sangre NNN y los medios líquidos como Schneider, RPMI, entre otros (Werner, 2013)

La sensibilidad es alrededor de 60-70%, pero las desventajas son que se requiere tener sistemas de incubación con temperatura controlada y microscopios invertidos, infraestructura limitada en las áreas endémicas (Werner, 2013).

4.4.1 Condiciones del cultivo.

La interacción entre reservorios y parásitos es compleja, multifactorial, circunstancial y dinámica; por ello constituye una unidad biológica que puede variar en función de los cambios del medio ambiente ya sea temperatura o pH; es decir, el cambio más notorio que experimentan los parásitos al pasar del insecto vector al huésped mamífero, es el de un incremento en la temperatura ambiente (Cárdenas et al., 2021).

Según estudios se ha demostrado que el pH influye en gran medida sobre el crecimiento de formas de amastigotes ya que estos se adaptan al medio ambiente ácido del fagolisosoma del macrófago, en el cual las diversas reacciones metabólicas se llevan a cabo a un pH cercano a 5 (Valencia et al., 1998).

Se han intentado cultivar amastigotes axénicos¹ a pH neutro con resultados desfavorables, ya que dicho pH permitió la aparición progresiva de promastigotes y formas intermedias en los cultivos. Posteriormente manipulando las condiciones de pH en cultivos axénicos se demostró que para que las células retuvieran la morfología de amastigote se requería de un pH ácido muy similar al de los fagolisosomas dentro del macrófago, entre 5 y 5.5 por tal motivo, la variación de pH a 5.5 del medio de cultivo empleado permitió la conversión de promastigotes en amastigotes, los cuales mantuvieron su morfología confirmándose las características acidofílicas que poseen estas formas del parásito (Valencia et al., 1998).

Se ha observado, a nivel experimental, que un incremento de la temperatura de 25 °C a 33-37 °C induce, los siguientes cambios en los promastigotes: las células se redondean, disminuyen en tamaño, pierden su flagelo y su movilidad, y se asemejan a los amastigotes intracelulares, no solo en su morfología sino también en sus propiedades bioquímicas. Además, se ha reportado que los amastigotes se adaptan al medio ambiente ácido de la fagolisosoma del

¹ Cultivo de un organismo aislado exento de cualquier otro organismo asociado o contaminante.

macrófago, en el cual las diversas reacciones metabólicas se llevan a cabo a un pH cercano a 5. Es necesario incluir parámetros específicos entre los que se incluyen: temperatura de incubación, pH, una atmosfera y un medio de cultivo definido. Los cuales son determinantes para mantener la viabilidad, crecimiento y proliferación adecuado de los parásitos (Valencia et al., 1998).

La estrategia de diferenciación debe simular la secuencia de eventos naturales experimentados durante el ciclo de vida del parásito, cuando circula entre el flebótomo y el huésped mamífero. Los cambios ambientales actúan como señales, interfiriendo en el patrón de expresión génica que permite la diferenciación de los parásitos. En este contexto, se ha evaluado si *in vitro* los cambios en el pH y la temperatura son capaces de desencadenar respuestas similares a las que suceden durante las interacciones huésped-parásito (Gomez, 2016)

4.4.2 pH.

Las condiciones de pH que permiten la diferenciación de promastigotes a amastigotes extracelulares en una especie, pueden no ser adecuadas para otra y en consecuencia, se requiere de condiciones individuales para cada especie o cepa. Por otro lado, los amastigotes obtenidos parecen ser muy semejantes a los observados en las lesiones de animales infectados experimentales desde el punto de vista morfológico y ultra estructural, en algunos antígenos de superficie y en su infectividad. Por ende, cualquier cambio en la actividad de transporte inducido por el pH se reflejará en cambios en los procesos metabólicos intracelulares correspondientes (Caamaño et al., 2016).

El valor de pH en el intestino medio del flebótomo aún se desconoce; sin embargo, si es similar al encontrado en otros mosquitos de > 8.5 , entonces debe ser alcalino. En el fagolisosoma infectado los parásitos encuentran un pH de 4.5 a 6.0 (Zilberstein & Shapira, 2016).

4.4.3. Temperatura

La combinación de pH bajo y temperatura alta induce la transformación del promastigote en amastigote en la mayoría de los casos; provoca cambios morfológicos similares a los que ocurren durante la transformación de promastigotes en amastigotes dentro de macrófagos de mamíferos: Los promastigotes se redondean y pierden su motilidad, flagelo acortado hasta el punto que se vuelven ovoides. También es reversible, al disminuir la temperatura, el flagelo vuelve a crecer y los parásitos recuperan su capacidad de proliferación. Estas alteraciones morfológicas debidas a los cambios de temperatura van acompañadas de

cambios en la expresión génica, indicando además la importancia de la temperatura en la etapa de transformación (Zilberstein & Shapira, 2016).

Dentro de las moscas de la arena, los promastigotes podrían experimentar temperaturas en el rango de 22- 28 °C. Tras la transmisión a su huésped mamífero, están expuestos a temperaturas más altas de 31 y 35 °C en lesiones cutáneas y hasta 37 °C en las vísceras dependiendo de la especie, pero nunca supera los 42°C (Zilberstein & Shapira, 2016).

4.5. Características morfológicas de promastigotes y amastigotes

Las formas morfológicas de leishmania fueron identificados en base a los siguientes criterios: los promastigotes se identificaron como fusiformes con un flagelo igual o más largo que el cuerpo celular, móviles y los amastigotes se identificaron como ovoides o redondos sin flagelo, inmóviles. Las formas similares a los amastigotes se realizó la tinción de Wright o Giemsa y se observó en el microscopio óptico (Li et al., 2017).

4.5.1. Re conversión de amastigotes en promastigotes

Se tomó una muestra de los amastigotes del medio *Drosophila* y se sembró en el medio primario NNN para promover la diferenciación en promastigotes y confirmar la viabilidad de estos amastigotes en función de su capacidad para volver a convertirse en promastigotes (Li et al., 2017).

4.6. Tratamiento

Se utiliza los fármacos antimoniales pentavalentes como estibogluconato sódico y el antimoniato de meglumina, en dosis de 10-20mg/kg/día por vía intramuscular o intravenosa por un tiempo de 10-20 días. Se han descrito diferentes tratamientos sistémicos como la pentamidina, con una disminución en su uso por los efectos tóxicos a nivel de páncreas, riñones y médula ósea. Se ha evaluado también el uso de anfotericina B en dosis máximas de 50 mg/día, debido a su buena eficacia. Además, se han incluido tratamientos locales, con mínima probabilidad de provocar desfiguración y con bajo riesgo de diseminación. Entre ellas, la infiltración de lesiones cutáneas con antimoniales cada 2-3 semanas, paramomicina, termoterapia, entre otros (Jiménez, 2016).

Los tratamientos actuales disponibles para las leishmaniasis requieren medicamentos de elevada toxicidad y limitada tolerancia, aunado a las múltiples barreras de acceso, entre ellas: proveedores limitados y algunas veces exclusivos de los medicamentos leishmanicidas; no inclusión de los medicamentos en las listas nacionales de medicamentos esenciales; disponibilidad limitada de los medicamentos en los mercados farmacéuticos; adquisiciones individualizadas; alto costo de los medicamentos; existencias limitadas y producción en función

de la demanda; productos no registrados en todos los países, además de los problemas relacionados a la gestión de suministro (Mears et al., 2015).

El meglumina antimoniato (MA) es el tratamiento convencional para la leishmaniasis en Ecuador, administrado por vía intramuscular durante 21 días continuos. Sin embargo, debido a su toxicidad y necesidad de inyecciones intramusculares, el tratamiento se abandona con frecuencia antes de su finalización, además, el fracaso terapéutico y la reactivación no son infrecuentes (Calvopiña et al., 2017).

5. Metodología

5.1 Tipo de estudio

El presente Trabajo de Integración Curricular fue de tipo descriptivo y experimental

5.2 Área de estudio.

El área de estudio se llevó a cabo en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico Médico de la Facultad de la Salud Humana, perteneciente a la Universidad Nacional de Loja, ubicado en la Av. Manuel Ignacio Monteros, Ciudad Loja.

5.3 Universo

El presente estudio se realizó con cultivos de *Leishmania spp.*

5.4 Muestra

Cultivos de promastigotes de *L. naiffi* en medio bifásico NNN.

5.5 Criterios de inclusión

- Cultivos puros de promastigotes
- Cultivos de promastigotes mantenidos a 25°C y con pH de 7.2
- Promastigotes en fase logarítmica de reproducción
- Promastigotes sin cambios morfológicos visibles.

5.6 Criterios de exclusión

- Cultivos en ensayo con contaminación bacteriana o micótica

5.7 Procesamiento en el laboratorio

5.7.1. Fase preanalítica

- **Promastigotes de *Leishmania naiffi***

La cepa de *L. naiffi* fue donado por el Instituto Oswaldo Cruz con el código 10CL1365, actualmente se encuentra en CDM, en medio NNN sangre de conejo desfibrinada, solución de Lock y con gentamicina 1 ml solución de gentamicina (10mg/ml), los parásitos fueron incubados a una temperatura de 25 °C donde se mantuvieron con pases sucesivos o resiembras cada siete días en cultivos frescos.

- **Medio NNN**

Para preparar el medio se utilizó 15% sangre de conejo desfibrinada e inactivada a 56°C durante 30 minutos, solución 1 ml de solución de gentamicina (10mg/ml), agar infusión cerebro-corazón; se distribuyen en tubos cónicos tapa rosca, 2 mL/tubo; en pico de flauta, luego se lo incuba a 37°C por 24–48 horas para control de esterilidad y se lo almacena en refrigeración a 8°C, la vialidad del medio 6 meses (*Anexo 3*).

- **Medio Schneider Drosophila**

Para preparar el medio Drosophila de la casa comercial (GIBCO®) se utilizó 10% de suero fetal bovino inactivado a 56°C x 30 min, 1 ml de solución de gentamicina (10mg/ml), se distribuyen en tubos cónicos tapa rosca, 2ml/tubo; luego se lo incubó a 37°C por 24–48 horas para control de esterilidad y se lo almacena en refrigeración a 8°C, revisar la transparencia de los tubos preparados con el medio Drosophila antes de su uso y debe conservar el color y transparencia (*Anexo 4.*)

- **Protocolo para ajuste de pH**

Para ajustar el pH en el medio de cultivo líquido Drosophila se calibró el medidor de pH con las soluciones tampón, se añadió la solución de HCl al 10%, después se esterilizó por filtración, se distribuyó en los tubos, se hizo control de calidad, 24h/ 37°C se procedió a colocar en refrigeración hasta el momento de su uso (*Anexo 5.*)

5.7.2. Fase analítica

- **Protocolo de conversión**

Para realizar la conversión, después de 3 días, los promastigotes en fase logarítmica, se tomó de 10 µL del sobrenadante del cultivo NNN, partiendo de una población de promastigotes del 100%, se sembró por triplicado en tubos que contienen 2 mL de medio de cultivo de Schneider Drosophila; los cultivos se sometieron a variaciones de pH y temperatura, se revisó diariamente por 10 días (*Anexo 6.*)

- **Protocolo para determinación % de conversión de parásitos en la cámara de Neubauer**

El recuento de parásitos de *L. naiffi* se lo realiza antes de la incubación para ver el crecimiento y para determinar aproximadamente la cantidad de promastigotes en cada tubo y después para determinar el % de conversión. Los recuentos se llevaron a cabo, desde el primer día, en cámara de Neubauer; para ello se tomó 10µL de cultivo original de los parásitos, se diluyó: 1/10 con solución Lock. La dilución se colocó en cada retículo para realizar el conteo de parásitos en los 5 cuadrantes que son los 4 cuadrados externos (L1, L2, L3, L4) y el cuadrado central (A, B, C, D, E) de cada retículo (2), dentro y sobre las líneas de la cámara. (L1, L2, L3, L4) y el cuadrado central (A, B, C, D, E) de cada retículo (*Anexo 7.*)

5.7.3. Características morfológicas de promastigotes y amastigotes

Las formas morfológicas de leishmania fueron identificados en base a los siguientes criterios: los promastigotes se identificaron como fusiformes con un flagelo igual o más largo que el

cuerpo celular, móviles y los amastigotes se identificaron como ovoides o redondos sin flagelo, inmóviles. Las formas similares a los amastigotes se realizó la tinción de Wright o Giemsa y se observó en el microscopio óptico (Li et al., 2017).

Tinción de Giemsa

Se realizó la tinción de Giemsa se observó el citoplasma, núcleo, y cinetoplasto

Re conversion de amastigote a promastigote

De igual forma se realizó la reconversion, se tomó una gota del medio Drosophila donde estaban los amastigotes y se sembró en el medio primario NNN en donde se promovió la diferenciación en promastigotes (*Anexo 8*).

Porcentaje de conversión

Para obtener el porcentaje de conversión, después de contar en la cámara de Neubauer, se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de conversión} = \frac{\text{\#amastigotes} \times 100}{\text{total de parasitos}}$$

5.8.Instrumentos de recolección de datos

En la presente investigación se utilizó formatos para registrar los resultados de conversión (*Anexo 9*).

5.8.1. Fase pos analítica

5.9. Procesamiento y análisis de resultados

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron analizados con bioestadística descriptiva, utilizando el programa Excel, donde se registró, la temperatura, pH, días de crecimiento y los resultados de conversión.

6. Resultados

Primero se realizó un pilotaje para establecer algunas posibles condiciones de pH y temperatura para determinar las que son favorables para la conversión, entre las importantes fueron a pH 4.6, 32°C, 50% de conversión; pH 5.01, 32°C, 78% de conversión; pH 5.5, 32°C, 72 % entre otras

Los promastigotes después de los primeros 7 días de incubación, sufrieron cambios morfológicos; acortamiento de flagelo reducción de tamaño y redondeo. Después de los 15 días de incubación más del 70% de los promastigotes eran redondos y sin flagelo. Cada cultivo se realizó por triplicado y se revisó diariamente hasta el día que hubo mayor conversión, posteriormente a ello, el porcentaje de conversión disminuyó

Tabla 1. Conversión de amastigotes a 32 0C y 10% de SFB

| pH | Días que hubo mayor conversión | Porcentaje de conversión |
|------|--------------------------------|--------------------------|
| 4.6 | 6 | 54 % |
| 5.01 | 6 | 80 % |
| 5.5 | 6 | 72 % |
| 6.4 | 6 | 62 % |
| 7.2 | 6 | 20 % |

Nota: Cada cultivo se realizó por triplicado y se revisó diariamente hasta el día que hubo mayor conversión, posteriormente a ello, el porcentaje de conversión tiende a disminuir

Tabla 2. Conversión de amastigotes a 34 °C y 10% de SFB

| pH | Días que hubo mayor conversión | Porcentaje de conversión |
|------|--------------------------------|--------------------------|
| 4.6 | 6 | 47 % |
| 5.01 | 6 | 32 % |
| 5.5 | 6 | 40 % |
| 6.4 | 6 | 55 % |
| 7.2 | 6 | 28 % |

Nota: Cada cultivo se realizó por triplicado y se revisó diariamente hasta el día que hubo mayor conversión, posteriormente a ello, el porcentaje de conversión tiende a disminuir

Tabla 3. Conversión de amastigotes a 35 °C y 10% de SFB

| pH | Días que hubo mayor conversión | Porcentaje de conversión |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 4.6 | 6 | 37 % |
| 5.01 | 6 | 30 % |
| 5.5 | 6 | 38 % |
| 6.4 | 6 | 50 % |
| 7.2 | 6 | 26 % |

Nota: Cada cultivo se realizó por triplicado y se revisó diariamente hasta el día que hubo mayor conversión, posteriormente a ello, el porcentaje de conversión tiende a disminuir

Tabla 4. Conversión de amastigotes a 37 0C y 10% de SFB

| pH | Días que hubo mayor conversión | Porcentaje de conversión |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 4.6 | 6 | 45 % |
| 5.01 | 6 | 35 % |
| 5.5 | 6 | 43 % |
| 6.4 | 6 | 49 % |
| 7.2 | 6 | 31 % |

Nota: Cada cultivo se realizó por triplicado y se revisó diariamente hasta el día que hubo mayor conversión, posteriormente a ello, el porcentaje de conversión tiende a disminuir

Interpretación

Para verificar la conversión de promastigotes a amastigotes la cual se expresa en %. En la presente tabla se puede evidenciar que, de las 2 condiciones de cultivo utilizados, pH de 5.01 y temperatura de 32°C tuvo mayor conversión con un 80% de amastigotes al sexto día de incubación, el cultivo con menor conversión fue a pH de 7.2 y temperatura de 32°C con un porcentaje del 20%.

7. Discusión

El presente estudio se obtuvo un máximo porcentaje de conversión del 80%, después de 6 días de incubación, a pH 5.01 , 32°C, en donde se probó 20 diferentes condiciones de cultivo para simular las condiciones ambientales que se producen intracelularmente, probamos cinco valores de pH (4.6, 5.01, 5.5, 6.4, 7.2) cuatro temperaturas (32°C, 34°C, 35°C, 37°C) y 2 concentraciones de suero fetal bovino (10%); esto se contrasta con el estudio realizado por Li et al., (2017) logró la conversión de la cepa de *L. mexicana*, del 94 %, a los 13 días, en condiciones de cultivo fueron semejantes, con la diferencia de que utilizo CO₂ y mayor concentración del suero fetal bovino (50%)

Otro estudio realizado por Teixeira et al., (2016), utiliza condiciones semejantes de cultivo, para 3 especies de leishmania con pH (5.4, 7.2) tres temperaturas (32°C, 34°C, 35°C,) y 2 concentraciones de suero fetal bovino (5% y 20%); obteniendo 98% de conversión para *L. braziliensis* a los 3 días de incubación, 97% a 32°C, para *L. amazonensis* a los 7 días de incubación y 90% de conversión para *L. chagasi* a los 13 días de incubación.

En otro estudio realizado por Rojas et al., (2020) en 2 especies de leishmania en medio Schneider, y con suero bovino fetal al 20%, usando diferentes pH (4,7 - 5,2 - 5,7 - 6,2) y temperatura de 35°C. El porcentaje de conversión para *L. braziliensis* y *L. peruviana* fue del 100% de promastigotes a amastigotes, a los 56 días de incubación

En otra investigación realizada por Clos et al., (2022) menciona que la exposición de promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum* *L. mexicana* y *L. (V.) braziliensis* a temperaturas elevadas (37°C, 32°C, 34 °C) y utilizando medios ácidos *in vitro* promueven su diferenciación a amastigotes. Esta conversión se da en 5 días y es reversible. Es decir, se puede realizar la conversión inversa de amastigotes a promastigotes disminuyendo la temperatura de incubación a (25 °C) y pH a (7- 7,4), esto tardaría 2 días

8. Conclusiones

- La mayor conversión de promastigotes a amastigotes se logró, a 32 °C con una conversión del 80%, mientras que a temperaturas más altas como la de 37 °C la tasa de conversión es mínima.
- La mayor tasa de conversión, 80%, se logró a pH 5,01 con pH más altos la tasa de conversión disminuye.
- Por lo antes observado, en la presente investigación y en los diversos estudios se puede decir que se requiere de condiciones específicas de temperatura, pH, concentración de suero fetal bovino, concentración de CO₂ y días de incubación para la conversión de promastigotes en amastigotes en las diferentes especies de leishmania.
- Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Integración Curricular corroboran con los resultados de los estudios antes mencionados; sí se puede convertir promastigotes en amastigotes, variando la temperatura y pH; por lo tanto, este estudio servirá como un aporte para las futuras investigaciones para las otras especies de leishmania
- Finalmente se realizó la difusión de los resultados obtenidos de la investigación a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

9. Recomendaciones

- Para evitar la contaminación bacteriana alternar el uso de antibióticos gentamicina y estreptomicina-penicilina en el medio NNN.
- Es recomendable utilizar conejo macho para la extracción de sangre por lo que hay que extraer cada 20 días
- Para suplementar el medio NNN, es mejor utilizar la solución de Lock

10. Bibliografía

- Abadías, I., Diago, A., & Cerro, P. (2021). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. 112, 602–605. . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>.
- Acero, V., Galeano, E., Ayala, M., Castellanos, J., & Bello, F. (2017). Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the Lulo cell line in different environmental conditions. *Colombian journal of entomology*, 32(2), 165–171.
- Asli, B., Dedee, M., & S, U. (2019). Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. *International Journal of Women's Dermatology*, 5(3), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.01.002>.
- Botero, D., & Restrepo, M. (2019). *Parasitosis Humanas*. 6th ed. *Medellín, Colombia: CIB Corporación para Investigaciones Biológicas Fondo Editorial*.
- Caamaño, M., Gutiérrez, C., Carrasquel, E., & Agrela, I. (2016). Establecimiento de un sistema in vitro para el cultivo de *Leishmania chagasi/ infantum* en macrófagos de perro. *Salus*, 12. <https://doi.org/1316-7138>.
- Calvopiña, M., Cevallos, W., Carrasquel, E., & Paredes, Y. (2017). Intralesional infiltration with meglumine antimoniate for the treatment of leishmaniasis recidiva cutis in Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1508–1512. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0340>.
- Chacón, K., Corral, G., & Sánchez, L. (2023). Caracterización del proceso de metaciclologénesis in vitro de promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*. *Revista Biomédica*, 34(1), 13-21. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v34i1.974>.
- Ching, A., Villalobos, B., & Jiménez, M. (2022). Leishmaniasis : evaluación clínica y diagnóstico. 7(4). . <https://doi.org/https://doi.org/10.31434/rms.v7i4.781>.
- Clos, J., Grünebast, J., & Holm, M. (2022). Promastigote-to-Amastigote Conversion in *Leishmania* spp.—A Molecular View. *Pathogens*, 11(9). . <https://doi.org/10.3390/pathogens11091052>.
- Correa, F., Romero, R., & Valdivieso, O. (2022). Guía para la atención médica de la leishmaniasis en México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/763280/Guia_Atencion_Leishmaniasis_Mexico.pdf.

- Domínguez, B. (2021). Nueva estrategia para el descubrimiento y desarrollo de fármacos .
[Universidad del Leon]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=305111>.
- Franchini, R., Fernández, C., & Sacchetti, M. (2017). eishmaniasis cutáneo- mucosa:
presentación de un caso con compromiso medio-facial. . *Rev. Fed. Argent. Soc.
Otorrinolaringol*, 24(2), 58–62. <http://www.faso.org.ar/revistas/2017/2/11.pdf>.
- Gómez, E. (2016). Dialoguemos la academia en la comunidad. En Ecuador sí hay
Tratamientos alternativos para la Leishmaniasis. <https://dialoguemos.ec/2016/08/en-ecuador-si-hay-tratamientos-alternativos-para-la-leishmaniasis/>.
- González , A., Osorio, C., & Talamás, P. (2017). Leishmaniosis. 68, 38–41.
<https://es.scribd.com/document/434157165/Leishmaniasi>.
- Gurel, M., Tekin, B., & Uzun, S. (2020). Leishmaniasis cutánea: una gran imitadora. *Clinics
in Dermatology*, 38(2), 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.10.008>.
- Hailu, A., & Frommel, D. (2019). Leishmaniasis. *EDUCACIÓN MÉDICA CONTINUA*, 14,.
- Hashiguchi, L., Vélez, N., & Hiroto, K. (2017). Leishmaniasis in Ecuador:
Comprehensive review and current status. *Acta tropica*, 166, 299-315.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.039>.
- INS. (2022). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública de Leishmaniasis. 28 de Marzo.
*Institute For International Cooperation in Animal. (2010). Leishmaniasis Cutánea y
Visceral* .
- Jaramillo, O., Azálea, A., Calvo, N., Mata, C., & Wasserman, H. (2018). La leishmaniosis
cutánea en Costa Rica: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Acta Médica
Costarricense*, 60(3), 103–114. <https://doi.org/10.51481/amc.v60i3.1004>.
- Jiménez, P. (2016). Leishmaniasis Cutánea. *Revista, Medica de Costa Rica y Centroamerica
Lxxiii (618) 17-21, 2016, 618, 19–20*.
<https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/618/art04.pdf>.
- Kumar, R., & Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in
Immunology*, 3(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>.
- Li, J., Zheng, Z., Natarajan, G., Chen, Q., Chen , D., & Chen, J. (2017). The first successful
report of the in vitro life cycle of Chinese Leishmania: the in vitro conversion of

- Leishmania amastigotes has been raised to 94% by testing 216 culture medium compounds. *Acta Parasitologica*. 62(1), 154–163. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0018>.
- Mears , E., Modabber, F., Don , R., & Johnson, G. (2015). A Review: The Current In Vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous . *PLoS Neglected Tropical Diseases*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003889>.
- Mendez, C. (2014). *CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA POR MEDIO DE PCR EN TIEMPO REAL*. Bogota.
- Minaya, G., & Torres, Y. (2015). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. Evaluación del la intradermorreacción con antígenos de Leishmania (Viannia) Peruviana y Leishmania (Viannia) Braziliensis En Áreas Endémicas de Leishmaniasis En el Perú, 1726–4634. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/medicina_experimental/v16_n1-2/eval_intra.htm#1.
- Ministerio de Salud Pública. (2022). *Enfermedades Transmitidas por Vectores*. <https://www.salud.gob.ec/gacetatas-vectoriales-2022/>.
- Morocho, L., Jaramillo, G., Cárdenas, F., & Zamora, L. (2021). Primer informe de Leishmania naiffi en Zamora Chinchipe (Ecuador) utilizando el gen que codifica la proteína HSP70. . *Cedamax*, 11(01), 43–47. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1035>.
- Navarro, E. (2010). Determinación de la actividad leishmanicida, tripanocida in vitro y valoración de la toxicidad aguda del ácido úsnico in vivo. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/3566/T1775.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- OMS. (2019). Programa de control de leishmaniasis. <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&act=8&ved=2ahUKEwjdiaTN4-z->.
- Rojas , J., Mesía, M., & Chacón, M. (2020). Obtención y mantenimiento en cultivo de amastigotes axénicos de Leishmania peruviana y Leishmania braziliensis. 374-375. <https://doi.org/https://doi.org/10.15381/anales.v8i1i3.18862>.

- Rojas, B. (2019). Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. *Med. Leg. Costa Rica*, 36(2), 82–94.
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000200082&lng=en.
- Rojas, D., Hernández, P., & Ayala, M. (2017). Clínica Para la Atención Integral Del Paciente con Leishmaniasis. https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2018/12/GPC_484_Alzheimer_AIAQS_resum.pdf.
- Teixeira, M., De Jesus Santos, R., & Sampaio, R. (2016). A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different Leishmania species. . *Parasitology Research*, 88(11), 963–968. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0695-3>.
- Urmeneta, C. (2019). Leishmaniasis humana. Un problema de salud pública. *NPunto*, 2(20), 25–45. <https://doi.org/https://orcid.org/0000-0002-5408-6263>.
- Valencia, G., Vera, B., Flores, A., & Andrade, F. (1998). Obtención de cultivo axénico de amastigotes de tres cepas de Leishmania (Leishmania) mexicana a partir de promastigotes aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada en México. *9(490)*, 206–213. <https://www.researchgate.net/publication/272745122%0A>.
- Vaz, R. (2012). Instrucciones de uso Giemsa.
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiUqqq7p7n9AhWjVTABHcvmDIwQFnoECEMQAQ&url=https%3A%2F%2Fes.renlab.ind.br%2Fwp-content%2Fuploads%2F2018%2F05%2FGiemsa.pdf&usg=AOvVawINqoa2ES5TuRr6n iHc4K4N>.
- Viresa. (1 de Febrero de 2021). *Vidriería y Reactivos S.A. de C.V.* . Obtenido de https://viresa.com.mx/blog_ph_medios_de_cultivo_control_calidad
- Werner, L. (2013). *Parasitología Humana*. pág, 298-308. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034->.
- Zambrano, P. (2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. TOSFERINA. Leishmaniasis.
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwig7IqP0In6AhV4kGoFHR7NBeYQFnoECDoQAQ&url=http%3A%2F%2Fsimudatsalud->

Zilberstein, D., & Shapira, M. (2016). The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Annual Review of Microbiology*, 48, 449–470.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002313>.

11. Anexos

Anexo 1. Oficio de pertinencia



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Facultad
de la Salud
Humana

OF. N° 020-2022-LAMY-CLC-UNL

Loja, 13 de julio de 2022

Doctora
Sandra Freire Cuesta
DIRECTORA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO-FSH-UNL.
Ciudad-

Ref: *Estructura y coherencia proyecto de tesis de Claudio Manuel Álvarez Jiménez*

De mi consideración:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para, en atención de su oficio 2022-0530 -CLC-FSH-UNL, de 28 de junio, hacer llegar el informe de estructura y pertinencia del proyecto de Tesis "Conversión in vitro de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes", presentado por Claudio Manuel Álvarez Jiménez, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

El informe fue evaluado en base al Art. 135 del Reglamento de Régimen Académico 2009.

Estructura

El proyecto se encuentra estructurado según lo dispone el Reglamento antes mencionado.

Coherencia y pertinencia

Luego de haber revisado el proyecto, sugerido varias modificaciones y cumplidas las correcciones propuestas informo a usted, salvando ilustrado criterio, que es coherente y pertinente su desarrollo.

Información que pongo en su conocimiento para los fines pertinentes.

De Ud. muy atentamente.

LUIS ALBERTO MOROCHO YAGUANA
Concedido digitalmente por LUIS ALBERTO MOROCHO YAGUANA. Fecha: 13 de julio de 2022. Hora: 12:02:17 PM. 2022-07-13 12:02:17 PM
Dr. Luis Morocho Yaguana, Mg.Sc.
Docente Carrera Lab. Clínico.

Anexo 2. Oficio de autorización para el uso del laboratorio



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Facultad
de la Salud
Humana

Of. No. 2022-0515-DFSH-UNL
Loja, 18 de julio de 2022

Señor
Claudio Manuel Álvarez Jiménez
ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
Presente.-

De mi especial consideración:

En atención a comunicación de 18 de julio de 2022, en mi calidad de Autoridad Académica de esta Facultad, en el marco del proyecto de tesis denominado: "CONVERSION IN VITRO DE PROMASTIGOTES DE LISHMANIA NAIFFI EN AMASTIGOTES"; autorizo el uso del Centro de Diagnóstico Médico, para el procesamiento de muestras y análisis conforme corresponda, bajo la supervisión del Dr. Luis Morocho Yaguana.

De la misma manera, autorizo a la Lic. Diana Ramón Montaña, Responsable del Centro de Diagnóstico Médico, brinde el apoyo requerido por el Sr. Álvarez Jiménez

Aprovecho la oportunidad para reiterar mi sentimiento de consideración y estima.

Atentamente,
**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA,
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VIDA.**



Firma digitalizada por:
**SANTOS AMABLE
BERMEO FLORES**

Dr. Amable Bermeo Flores, Mg. Sc.
DECANO FACULTAD DE LA SALUD HUMANA UNL.

Cc: Carrera Laboratorio Clínico, Lcda. Diana Ramón Montaña, Archivo.

ABF/ Yadira Córdova.
ANALISTA DE DESPACHO DE AUTORIDAD ACADÉMICA

Anexo 3. Protocolo para la preparación del medio de cultivo (NNN)

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR</p> | Protocolo para la preparación del medio de cultivo (NNN) | Anexo: 3 |
| | | Nº páginas: 2 |
| Equipo/Área: Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico Médico | | |

Objetivo: Describir el procedimiento para la preparación del medio de cultivo primario triple NNN

Alcance: Este protocolo lo aplican los tesisistas y técnicos que desarrollan sus actividades investigativas con cultivos de *Leishmania* en el Centro de Diagnóstico Médico de la FSH-UNL, usando el medio NNN

Fundamento: El medio NNN es un medio común y mundialmente conocido para el aislamiento del agente del género *Leishmania*, que causa Leishmaniasis (cutánea, mucocutánea o visceral). El cultivo de este organismo en un medio adecuado da lugar a la forma móvil, extracelular llamada, promastigote. El medio de cultivo se utiliza para simular el entorno bioquímico que se encuentra dentro del vector del flebótomo

Responsable: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Materiales y reactivos:

- Sangre desfibrinada de conejo inactivado (30m a 56°C.)
- Agar base: Agar cerebro-corazón
- Solución de Lock
- solución de gentamicina (10mg/ml),
- Penicilina-Estreptomicina 200 µg/100 ml (10.000 unidades de Penicilina / 10 mg Estreptomicina), Marca Sigma-Aldrich, Lot#0000155850
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca estériles
- Matraz de 250 mL estéril
- Plancha calefactora
- Agua destilada
- Pipeta serológica estéril 10 o 20ml
- Pro-pipeta estéril

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Estufa
- Balanza analítica
- Incubadora

Procedimiento

1. Desinfectar cámara, preparar el material y ubicarlo en la cámara
2. Pesar 5,2 g de agar base cerebro corazón
3. Disolver el agar pesado en 84 ml de agua destilada y calentar hasta ebullición sellar y auto clavar por 15 minutos a 121°C.
4. Dejar enfriar aproximadamente 50 °C agregar 15 ml de sangre de conejo
5. Agregar 1ml de solución de antibiótico de gentamicina o penicilina + streptomina
6. Mezclar y dispensar 2 ml por tubo.
7. Dejar gelificar en pico de flauta.
8. Refrigerar por 15 minutos y luego suplementar con 1ml de solución de Lock e incubar 24 horas a 37°C para control de calidad
9. Refrigerar

Bibliografía

Girard, R. (2014). Técnicas para Laboratorios y Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas. Manual De Parasitología, 1(3), 01(21). pp.
http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/flash/files/res/downloads/page_0021.pdf
<http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/pdf/ManualParasitologia3.pdf>
Acamilaestela12@yahoo.com

| | |
|-----------------------|--------------------------------|
| ELABORADO POR: | Claudio Manuel Álvarez Jiménez |
| Aprobado por: | Dr. Luis Morocho. Mg. Sc |

Anexo 4. Protocolo para preparación del medio de cultivo *Drosophila*

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR</p> | Protocolo para la preparación del medio de cultivo <i>Drosophila</i> | Anexo: 4 |
| | | Nº páginas: 2 |
| Equipo/Área: Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico Medico | | |

Objetivo: Describir el procedimiento para la preparación del medio de cultivo *Drosophila* en el cual se va a dar la conversión de promastigotes

Alcance: El presente procedimiento provee información práctica y aplicable para preparar el medio *Drosophila* para la conversión de promastigotes

Definiciones: Son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos

Responsable: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Materiales y reactivos:

- Medio Schneider *Drosophila*
- solución de gentamicina (10mg/ml),
- Suero Fetal Bovino (inactivado) 30 min a 56°C a baño María
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca 45 ml estériles
- Probeta 50 mL estéril
- Vaso de precipitación 50 ml estéril
- Filtros para jeringuilla (PES polietersulfona, diámetro de 30 mm x 0,22 µm p/jeringuilla)
- Gradilla
- Jeringuilla de 50 mL
- Aguja calibre 16 x 1.5 pulgadas

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Estufa
- Balanza analítica
- Incubadora

Procedimiento

1. En una probeta colocamos 10 ml de suero fetal bovino inactivado
2. Agregar 1ml de una solución de 200 ug/ml de antibiótico gentamicina
3. Agregar medio Drosophila hasta 50 mL
4. Colocar en un vaso de precipitación, estéril pasar a jeringuilla, colocar el filtro y dispensamos en los tubos o frascos de cultivo a razón de 2 ml por tubo
5. Refrigerar hasta el momento de su uso.

Bibliografía

Teixeira, M.. (2016). A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different Leishmania species. *Parasitology Research*, 88(11), 963–968.

<https://doi.org/10.1007/s00436-002-0695-3>

Heredia, N. S., Ávila, A. S., Velásquez, L. E., Heredia, N. S., Ávila, A. S., & Velásquez, L. E. (2018). In vitro culture of L3 larvae of nematodes obtained from the African giant snail *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) in Santa Fe de Antioquia. *Biomédica*, 38, 24–29. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408>

| | |
|-----------------------|--------------------------------|
| ELABORADO POR: | Claudio Manuel Álvarez Jiménez |
| Aprobado por: | Dr. Luis Morocho. Mg. Sc |

Anexo 5. Protocolo para ajuste de pH

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR</p> | Protocolo para el ajuste de pH | Anexo: 5 |
| | | Nº páginas: 2 |
| Equipo/Área: Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico Médico | | |

Objetivo: Describir el procedimiento para el ajuste de pH del cultivo *Drosophila*

Alcance: Este protocolo lo aplican los tesisistas y técnicos que desarrollan sus actividades investigativas con cultivos de *Leishmania* en el Centro de Diagnóstico Médico de la FSH-UNL, usando el medio *Drosophila* según Schneider

Definiciones: Ayudar al crecimiento del parásito

Responsable: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Materiales y reactivos:

- Ácido clorhídrico 10% p/v
- Pipeta serológica
- Medio de cultivo (*Drosophila*)
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca
- Vaso de precipitación 50 ml
- Filtros para jeringuilla (PES polietersulfona, diámetro de 30 mm x 0,22 µm p/jeringuilla)
- Gradilla
- Jeringuilla
- Puntas

Equipos

- Medidor de pH
- Incubadora
- Cámara de bioseguridad

Procedimiento

1. Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, mandil

2. Calibrar el medidor de pH
3. A los tubos con medio Drosophila agregar HCL hasta el pH deseado
4. Esterilizar por filtración, dispensar en los tubos tapa rosca a razón de 2 ml por tubo
5. Incubar a 37°C por 24 horas, verificar esterilidad
6. Refrigerar hasta el momento de su uso

Bibliografía

Viresa.(2021). Determinación de pH en medios de cultivo como prueba de control de calidad

Obtenido de https://viresa.com.mx/blog_ph_medios_de_cultivo_control_calidad

| | |
|-----------------------|--------------------------------|
| ELABORADO POR: | Claudio Manuel Álvarez Jiménez |
| Aprobado por: | Dr. Luis Morocho. Mg. Sc |

Anexo 6. Protocolo para la conversión de promastigotes a amastigotes

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR</p> | Protocolo para la conversión de promastigotes a amastigotes | Anexo: 6 |
| | | Nº páginas: 3 |
| Equipo/Área: Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico Medico | | |

Objetivo: Realizar la siembra de promastigotes del cultivo primario en fase logarítmica, en el medio de cultivo para incubar a diferentes temperaturas y distintos pH.

Alcance: El presente procedimiento provee información práctica y aplicable realizar la conversión de promastigotes en amastigotes

Responsable: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Definiciones: El presente estudio describe la obtención de formas de amastigotes de *Leishmania naiffi* mediante la variación del pH y la temperatura de incubación. Los promastigotes se encuentran en mantenimiento en el medio bifásico triple NNN más solución de Lock, pH de 7.2 y temperatura de 25⁰C, en frascos de cultivos celulares

Materiales y reactivos:

- Pipeta serológica
- Puntas estériles
- Tubos con medio Drosophila de pH requerido
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Incubadora

Procedimiento

1. Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, mandil)
2. Introducir el material en la cabina de bioseguridad previamente esterilizado y desinfectado
3. Tomar una muestra de 1×10^6 parásitos/mL del sobrenadante del cultivo NNN que contiene promastigotes
4. Sembrar por triplicado en tubos que contienen 2 ml de medio de cultivo Drosophila CON Ph requerido modificado
5. Incubar a temperatura de 32°C, 34°C, 35°C, 37°C
6. Tomar una 1 gota a partir del 2do día de incubación y

colocar en el portaobjetos, observar en el microscopio objetivo de 40x

7. Anotar los cambios morfológicos de los promastigotes

Bibliografía

Li, J., Zheng, Z., Natarajan, G., Chen, Q., Chen, D., & Chen, J. (2017). The first successful report of the *in vitro* life cycle of Chinese *Leishmania*: the *in vitro* conversion of *Leishmania* amastigotes has been raised to 94% by testing 216 culture medium compounds. *Acta Parasitologica*, 62(1), 154–163. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0018>

| | |
|-----------------------|--------------------------------|
| ELABORADO POR: | Claudio Manuel Álvarez Jiménez |
| Aprobado por: | Dr. Luis Morocho. Mg. Sc |

Anexo 7. Protocolo para diluciones

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR</p> | Protocolo para dilución del medio NNN con parásitos | |
| | | Anexo: 6 |
| Equipo/Área: Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico Médico | | Nº páginas: 3 |

Objetivo: Describir el procedimiento para diluir una muestra

Alcance: Este protocolo lo aplican los tesisistas y técnicos que desarrollan sus actividades investigativas con cultivos de *Leishmania* en el Centro de Diagnóstico Médico de la FSH-UNL, para el recuento de promastigotes de *leishmania naiffi* en la cámara de Neubauer

Fundamento: Se utiliza para realizar recuentos de algunos tipos celulares como hematíes, glóbulos blancos, plaquetas, y en este caso en particular se utilizará para para saber el número de parásitos que se encuentran aproximadamente en el medio de cultivo.

Responsable: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Materiales y reactivos:

- Muestra (Cultivo de parásitos)
- Solución de Lock
- Puntas 10-100 µl
- Pipetas de 10-100 µl

Equipos:

- Microscopio de campo claro

Procedimiento:

1. Homogenizar la muestra
2. Se realiza una dilución 1:10 con solución de Lock
3. Pipetear 10 µL de la muestra
4. Pipetear 90 µL de solución de Lock
5. Homogenizar y observar al microscopio

Bibliografía

Reactlab,(2019) Procedimiento practico para realizar diluciones

<https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2022/04/Proceso-Dilucion-B12-1.pdf>

| | |
|-----------------------|--------------------------------|
| Elaborado Por: | Claudio Manuel Álvarez Jiménez |
| Aprobado por: | Dr. Luis Morocho. Mg. Sc |

Anexo 8. Protocolo para recuento en la cámara de Neubauer

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico LOJA - ECUADOR</p> | Protocolo para el recuento de parásitos en la cámara de Neubauer | Anexo: 7 |
| | | Nº páginas: 2 |
| Equipo/Área: Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico Médico | | |

Objetivo: Describir el procedimiento para contar parásitos en una suspensión

Alcance: Este protocolo lo aplican los tesisistas y técnicos que desarrollan sus actividades investigativas con cultivos de *Leishmania* en el Centro de Diagnóstico Médico de la FSH-UNL, para el recuento de promastigotes de *leishmania naiffi* en la cámara de Neubauer

Fundamento: La técnica se basa en el uso de la cámara de Neubauer la cual se usa para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido, también para realizar recuentos de algunos tipos celulares como hematíes, glóbulos blancos, plaquetas, y en este caso en particular se utilizará para para saber el número de parásitos que se encuentran aproximadamente en el medio de cultivo.

Está constituida por 2 retículos, uno en la parte superior y otro en la inferior, los cuales poseen divisiones en forma cuadrículada

Responsable: Claudio Manuel Álvarez Jiménez

Materiales y reactivos:

- Cultivo de parásitos
- Solución de Lock
- Puntas 10-100 µl
- Pipetas de 10-100 µl
- Cámara de Neubauer
- Cubre objetos

Equipos:

- Microscopio de campo claro

Procedimiento:

6. Homogenizar los cultivos
7. Pipetear 10 µl de los cultivos mantenidos a diferentes pH y temperatura
8. Se realiza una dilución 1:10 con solución de Lock

9. Colocar en los 2 retículos de la cámara de Neubauer y colocar el cubreobjetos
10. Observar en el microscopio con el objetivo de 40x

Cálculo de resultados:

- Recuento total de parásitos por 10 cuadrados = Recuento del retículo superior que tiene (4 cuadrados externos) y (1 cuadrado central) + Recuento del retículo inferior (4 cuadrados externos) y (1 cuadrado central)
- $R = \frac{x}{2}$
- R= Recuento promedio en la cámara de Neubauer
- X = Total de parasitos en los 10 cuadrados
- Total, de parásitos en el medio de cultivo = parásitos/ml *volumen de cultivo

Lectura e Interpretación

Para el presente protocolo se considerará, los parásitos con las siguientes características:

Promastigotes:

- Móviles
- Presencia visible de flagelo
- Forma alargada típica

Amastigotes:

- Inmóviles
- Sin presencia de flagelo
- Forma redondeada

Nota:

Reconversión de amastigote a promastigote

Para la reconversión, se toma una gota del cultivo con amastigotes del medio *Drosophila* se siembra en el medio primario NNN en donde se promovió la diferenciación en promastigotes. Revisar al 3-4 día, se debe observar los promastigotes

Objetivo: Describir el procedimiento para la tinción de las placas con Giemsa para observar la morfología del parásito

Alcance: Actividades que se deben cumplir para observar las características morfológicas de algunas células y parásitos

Fundamento: La técnica se basa en el uso del colorante Giemsa; compuesto por azul de metileno y eosina, el azul de metileno es un colorante básico va a teñir las partes básicas del

parasito como el citoplasma y la eosina actúa como un colorante ácido; va a teñir el núcleo, y cinetoplasto

Materiales y reactivos:

- Colorante Giemsa
- Alcohol metílico (metanol) 70 %
- Agua destilada tamponada pH 7.2
- Agua destilada
- Portaobjetos
- Pipetas Pasteur
- Soporte de placas

Procedimiento

1. Extender una fina capa del cultivo
2. Dejar secar al ambiente
3. Fijar la muestra con metanol 1 a 2 minutos
4. Colocar la colorante de Giemsa preparada (9ml agua destilada tamponada/1ml colorante Giemsa)
5. Dejar actuar por 30 minutos o mas
6. Lavar con agua destilada
7. Dejar secar al ambiente
8. Observar con el objetivo de 100x

Bibliografía

Organizacion Mundial de la Salud. (1 de Enero de 2016). Tincion de Giemsa de extensiones de sangre para el diagnostico microscopico del paludismo.

| | |
|-----------------------|--------------------------------|
| ELABORADO POR: | Claudio Manuel Álvarez Jiménez |
| Aprobado por: | Dr. Luis Morocho. Mg. Sc |

Anexo 11. Difusión de resultados



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**



Nota. Ilustración. Socialización de resultados en el auditorio Antonio Peña Celi, de la Facultad de la Salud Humana, el día 14 de febrero del 2023. Asisten estudiantes y Docentes.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

Tema: Difusión de resultados de Conversión *in vitro* de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes

Fecha: 14 de febrero del 2023

Registro de asistencia: Estudiantes

| Nombres y apellidos | Ciclo | Cedula | Firma |
|------------------------------------|-------|------------|---------|
| Jemy Judith Montano Gonzalez | I | 1105790342 | [Firma] |
| Marco Jhonatan Uchuarf Nuro | I | 1150187980 | [Firma] |
| Jesly Yamila TT Tacuri Yaguache | I | 1105854697 | [Firma] |
| Mayra Elizabeth Heredia Vega | I | 1105381246 | [Firma] |
| Thoko Belen Vassquez Leon | I | 1150493177 | B |
| Jonathan Alejandro Patten Parra | VII | 1150237376 | [Firma] |
| Manuel Plon Quichimbo Agila | VII | 1104446990 | [Firma] |
| Marilyn Anais Mabeatus Bravo | VII | 1150075594 | [Firma] |
| Tanya Yuliso Agila Cuenca | VII | 1150065298 | [Firma] |
| Alex Gabriel Ordaz Camillo | VII | 1105710891 | [Firma] |
| Hargoth Alexandra Johana Gutierrez | VII | 1150495564 | [Firma] |
| Erick Jair Aguilar Deleon | VI | 1150021135 | [Firma] |
| Karen Elizabeth Alvarez Rebolledo | VIII | 1105673410 | [Firma] |
| Josi Miguel Maza Parada | VI | 1105584837 | [Firma] |
| Melgor Adrian Barrios | II | 1105522260 | [Firma] |
| Maria Augusta Gonzalez | II | 1150383514 | [Firma] |
| Junior Ernesto Morales | II | 1106005299 | [Firma] |
| Oliver Leon Pezalla | II | 1150078562 | [Firma] |
| Milena Monserath Poma B. | III | 1150150645 | [Firma] |
| Evel Taver Polanco | III | 1150805838 | [Firma] |
| Javier Jose Tacuri | III | 1104446651 | [Firma] |



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

Tema: Difusión de resultados de Conversión *in vitro* de promastigotes de
Leishmania naiffi en amastigotes

Fecha: 14 de febrero del 2023

Registro de asistencia: Estudiantes

| Nombres y apellidos | Ciclo | Cedula | Firma |
|----------------------------------|-------|-------------|-------|
| Carlos D. Bustamante Acevedo | V | 1105110173 | |
| Carlos D. Lupo Yanangómez | V | 1105823171 | |
| Cristian García Jato | V | 1719038118 | |
| Piero Ricardo Muroyo Herrera | VI | 1150573180 | |
| José Miguel Mora Paredes | VI | 110558483-1 | |
| Jamileira Mabel García A. | VIII | 1150436205 | |
| Frieta Anabel Arévalo Abad | VIII | 1105996233 | |
| Natalia Georgina Betancur Medina | VIII | 1150582664 | |
| Valeria Otilia Román | VIII | 1106249251 | |
| Stephany Cuervo Galán | VIII | 1150064026 | |
| Maria José Quezada | VII | 1150257936 | |
| Alisson Quezada | VIII | 1105857112 | |
| Johanna M. Guzmán García | VIII | 1104540958 | |
| Mario José Aguilar Albino | VIII | 1105120008 | |
| Gabriel Morales Morales L. | VIII | 1105241263 | |
| Diana Nicol Navillo Galvez | VIII | 1105941301 | |
| Loena Valera Alejandro Villa | VIII | 1104647894 | |
| Nancy Aracely Guzmán Cabrera | VIII | 1150040960 | |
| Marcia Piedad Lozano | VIII | 1105215344 | |
| Paula Lisvette García Velez | VI | 0705838936 | |
| Adrian Gabriel Castiblanco | VI | 1958094233 | |
| José David Jimba Jimeno | VI | 0750349011 | |
| Eulsoche Estefanía Nijra Ugo | VI | 1150385704 | |



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Tema: Difusión de resultados de Conversión *in vitro* de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes

Fecha: 14 de febrero del 2023

Registro de asistencia: docentes

| Nombres y apellidos | Ciclo | Cédula | Firma |
|-----------------------------|-------|--------------|-----------------------------|
| Alicia Villavicencio Obando | | 1104723067 | Alicia Villavicencio |
| Juanma Zúñiga Román | | 1900482637 | Juanma Zúñiga |
| María del Cónce Jiménez M | | 1103715062 | María del Cónce Jiménez |
| Carolina Villacuri G | VI | 1103457542 - | Carolina Villacuri |
| Angel Luzuriaga Ramirez | VI | 1104440618 | Angel Luzuriaga |
| Juanella Fátima de los Rios | X | 1102355797 | Juanella Fátima de los Rios |
| Juana Coli Corrión | | 1104417918 | Juana Coli Corrión |
| Denisse Bermeo Armijos | III | 1104882624 | Denisse Bermeo Armijos |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Anexo 12. Evidencias fotográficas



Descripción: Inactivación de la sangre de conejo, Baño maría.



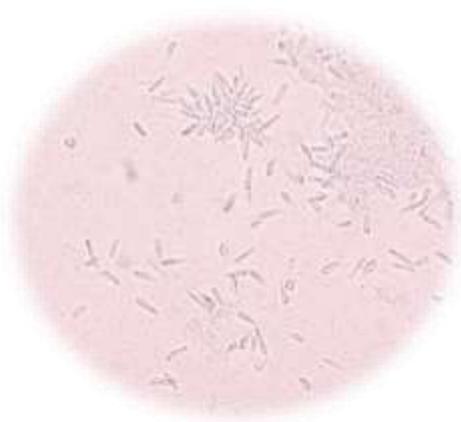
Descripción: Preparación del medio Drosophila



Descripción: Ajuste de pH



Descripción: Filtración del medio Drosophila



Descripción: Promastigotes mantenidos NNN. Objetivo 40x



Descripción: Amastigotes tinción Giemsa. Objetivo 100x

Anexo 13. Certificación de traducción del Abstract

Loja, 5 de mayo de 2023

Lic.

José Luis Salazar Tamayo MSc.

ENGLISH TEACHER

CERTIFICA:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés del resumen de tesis **“Conversión in vitro de promastigotes de *Leishmania naiffi* en amastigotes”**, autoría de **Claudio Manuel Álvarez Jiménez** con número de cédula **1150647558**, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al portador del presente documento, hacer uso del mismo, en lo que a bien tenga.

Atentamente. -

.....

Lic. José Luis Salazar Tamayo MSc.

1104968845

N* Registro Senescyt 3er nivel **1031-2016-1669759**

N* Registro Senescyt 4to nivel **1050-2021-2402283**