

TE
UVTe
Biol
F91
1988

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

EVALUACION DE CINCO AGENTES ANTIMICROBIALES
PARA LA ELIMINACION DE CONTAMINACION
MICROBIANA EN EL CULTIVO DE
Leishmania braziliensis

MARIA ADELA DENISE FUENTES TEJADA

Guatemala

1988

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

EVALUACION DE CINCO AGENTES ANTIMICROBIALES
PARA LA ELIMINACION DE CONTAMINACION
MICROBIANA EN EL CULTIVO DE
Leishmania braziliensis

MARIA ADELA DENISE FUENTES TEJADA

Trabajo de investigación presentado para
optar al grado académico de

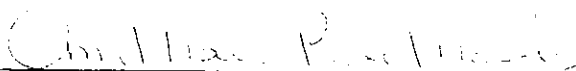
Licenciatura en Biología

Guatemala

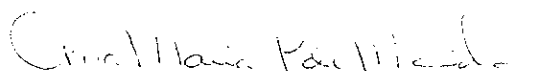
1988

EVALUACION DE CINCO AGENTES ANTIMICROBIALES
PARA LA ELIMINACION DE CONTAMINACION
MICROBIANA EN EL CULTIVO DE
Leishmania braziliensis

Vo.Bo.:

f 
Lic. Ana Ma. P. de Mérida
Asesora

Tribunal:

f 
Lic. Ana Ma. P. de Mérida

f 
Dr. Thomas Navin

f 
Lic. Celia Gordón de Rosales

Fecha de aprobación: 28 de octubre de 1988

A Dios
A mis padres Federico y Alba
A mis hermanas Anabella y Karin
A mi cuñado Juan Carlos
A mi sobrino Carlos Enrique
A mis sobrinas Krista y María Inés
A mi futuro esposo Hans y
A mis amigas Mercy, Tere y Lu.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Thomas Navin y a la Lic. Ana María de Mérida por su valiosa colaboración en la asesoría, corrección y orientación del presente trabajo. A la Lic. Celia de Rosales y a la Dra. Margaret Dix por sus comentarios y correcciones. Por su ayuda en el análisis estadístico a Jaime Sosa, por la elaboración de gráficas a Silvetz Ramírez, por la corroboración de datos al Dr. Juan Carlos García y muy especialmente a Hans Graf por su apoyo moral y su ayuda en la elaboración de los detalles finales.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	xii
I INTRODUCCION	1
II MATERIALES Y METODOS	10
A. Obtención de la muestra	11
B. Preparación del medio	13
C. Preparación de los antibióticos	15
D. Inoculación, crecimiento y medidas	16
III RESULTADOS	18
IV DISCUSION	39
V CONCLUSIONES	51
VI LITERATURA CITADA	52
VII ANEXOS	55
APENDICES	
I Ciclo vital de <i>Leishmania</i>	55
II Componentes del medio Schneider	56
III Datos brutos	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Determinación de tres cepas de <i>Leishmania</i> hasta subespecie por el método de sonda y por el método de isoenzimas.	12
2	Análisis Trifactorial de varianza para la concentración máxima de promastigotes comparada con antibiótico, concentración y subespecie	31
3	Análisis Trifactorial de varianza para el día en que se obtuvo la concentración máxima de promastigotes comparada con antibiótico, concentración y subespecie	32
4	Análisis Trifactorial de varianza para el período en que se mantiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 expresada en días comparada con antibiótico, concentración y subespecie	33
5	Resultados de la prueba de Tukey de la interacción antibiótico-subespecie en referencia al Cuadro # 4	34
6	Análisis Trifactorial de varianza para el día en que se alcanza por primera vez una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 comparada con antibiótico, concentración y subespecie	35
7	Resultados de la prueba de Tukey de la interacción antibiótico-subespecie en referencia al Cuadro # 6	36
8	Resultados de la prueba de Tukey de la interacción concentración-subespecie en referencia al Cuadro # 6	37
9	Porcentajes de contaminación en cultivos de <i>L. braziliensis</i> en medio Evans-Shneider	38

III-1	Promedios de crecimiento de <i>L. braziliensis</i> ssp. (subespecie #1) y <i>L. b. braziliensis</i> (subespecie #2) durante 23 días	57
III-2	Medianas de conteos de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en cuatro concentraciones de penicilina	58
III-3	Medianas de conteos de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en cuatro concentraciones de gentamicina	59
III-4	Medianas de conteos de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en cuatro concentraciones de estreptomycinina	60
III-5	Medianas de conteos de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en cuatro concentraciones de amikacina	61
III-6	Medianas de conteos de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en cuatro concentraciones de 5-fluorocitosina	62
III-7	Valores de las variables utilizadas en el análisis de varianza (ANDEVA) Trifactorial para el caso de <i>L. braziliensis</i> ssp. o subespecie #1	63
III-8	Valores de las variables utilizadas en el análisis de varianza (ANDEVA) Trifactorial para el caso de <i>L. b. braziliensis</i> o subespecie #2	65

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Crecimiento de dos subespecies de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio Evans-Schneider	25
2	Efecto de penicilina en el crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio Evans-Schneider	26
3	Efecto de gentamicina en el crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio Evans-Schneider	27
4	Efecto de estreptomycinina en el crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio Evans-Schneider	28
5	Efecto de amikacina en el crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio Evans-Schneider	29
6	Efecto de 5-fluorocitosina en el crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i> en medio Evans-Schneider	30
7	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	55

RESUMEN

La contaminación de cultivos por microorganismos oportunistas es un problema serio para las entidades que se dedican al estudio de enfermedades parasitarias, en donde parte de la investigación consta del cultivo del microorganismo en laboratorio y algunas veces en el campo.

El conocimiento sobre el uso de agentes antimicrobiales y sus dosis en el cultivo de *Leishmania in vitro* es escaso. La penicilina, antibiótico de conocimiento universal, se utiliza frecuentemente solo o en combinación con otros agentes, tales como gentamicina o estreptomycin. Los antimicóticos son menos conocidos y por lo tanto su uso no es tan frecuente.

Se utilizaron cultivos de dos subespecies de *Leishmania braziliensis* para la evaluación de los antibióticos penicilina, gentamicina, estreptomycin y amikacina y el antimicótico 5-fluorocitosina en concentraciones de 0, 50, 100 y 200 ug/ml. El medio utilizado fue Evans, combinado con sangre, como la fase sólida y Schneider, combinado con suero fetal de ternero, como sobrenadante o fase líquida. Se hicieron tres experimentos por separado: con *L. braziliensis ssp.* (subespecie no determinada) proveniente

de lesión humana, con *L. braziliensis braziliensis* proveniente de lesión humana y con *L. braziliensis braziliensis* proveniente de lesión de hamster. En los tres experimentos se evaluaron los 5 agentes en sus 4 concentraciones.

Se hicieron conteos diarios de la población (promastigotes viables por mililitro de medio) tomando como criterio de viabilidad la presencia de movimiento flagelar en los parásitos. Se trazaron curvas de crecimiento con medidas de tendencia central.

Hubo diferencia significativa en el crecimiento de la subespecie no determinada respecto de la *L. b. braziliensis*, sin tomar en cuenta el tipo de agente o la concentración a la cual se encontraba. Según los aspectos evaluados, *L. braziliensis braziliensis* creció mejor que *L. braziliensis ssp.* Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre agentes o entre concentraciones. Aparentemente, ningún agente inhibió el crecimiento del parásito a las concentraciones probadas.

En general, se recomienda utilizar cualquiera de los antibióticos en combinación con el antimicótico para reducir el riesgo de contaminación de bacterias y hongos. La concentración puede quedar a criterio del investigador.

I INTRODUCCION

La Leishmaniasis es una causa importante de morbilidad y mortalidad de los países en desarrollo (Pearson 1984). En el humano, comprende un espectro heterogéneo de infecciones. Se distinguen tres formas principales: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral, en donde el tipo visceral es potencialmente letal. La infección es causada por protozoos del género *Leishmania* y transmitidas por las hembras flebotominas (moscas de arena) *Phlebotomus*, *Psychodopygus*, *Sergentomyia* y *Lutzomyia* (ver Apéndice I). La ocurrencia de leishmaniasis cutánea se restringe a áreas selváticas con alta humedad y temperatura, en donde los vectores están presentes. Personal militar, viajeros y trabajadores en áreas endémicas pueden adquirir la enfermedad e importarla a áreas no endémicas. El período de incubación varía de meses a varios años. Otras formas de transmisión, por ejemplo, vía transfusión sanguínea o contagio también deben considerarse (Kern 1981).

Por ser una enfermedad tropical incidente y prevalente, la leishmaniasis ha sido seleccionada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las seis enfermedades principales a estudiar en su Programa Especial de

Investigación y Entrenamiento de Enfermedades Tropicales (Pearson 1984).

La leishmaniasis cutánea es causada en Latino América por los complejos (grupos de parásitos con propiedades biológicas y bioquímicas comunes) *L. mexicana* y *L. braziliensis*; y en Africa, Medio Oriente y Europa Mediterránea por el complejo *L. tropica*. Los síndromes clínicos, vectores y especies de *Leishmania* varían según la localización geográfica (Pearson 1984). Los complejos representantes de la leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo tienen las siguientes características:

(1) El complejo de *Leishmania mexicana*, parásitos que causan principalmente lesiones cutáneas en humanos, tienden a crecer bien en medios de cultivo y producen lesiones metastásicas prominentes cuando se inoculan en hamsters.

(2) El complejo de *Leishmania braziliensis*, parásitos que causan lesiones cutáneas y mucocutáneas en humanos, crecen relativamente poco en medios de cultivo y tienen poca virulencia en hamsters (Brown y Neva 1983).

El diagnóstico de leishmaniasis cutánea se basa en la toma de muestra de la lesión, seguida de la identificación del parásito en frotos coloreados, el aislamiento del

parásito en cultivos o en hamsters, o la evidencia inmunológica en el establecimiento clínico apropiado (Pearson 1984). Existen varios métodos para tomar la muestra de una lesión, dos de ellos son: la biopsia y el aspirado. La biopsia consiste en cortar, con un bisturí estéril, un trocito de piel de la lesión. Este se somete a cierto procedimiento (maceración y centrifugación) antes de hacer un cultivo. El aspirado consiste en sacar líquido de la lesión con una jeringa estéril. Este líquido se somete a centrifugación antes de inocularse. Al mismo tiempo, la demostración y el cultivo de los parásitos en lesiones de pacientes se hace muy difícil por varias razones, tales como el tamaño limitado de la muestra que se pueda obtener, el número reducido de parásitos y especialmente la contaminación secundaria por bacterias y hongos levaduriformes (Palomino et al. 1983).

Para todo cultivo de organismos *in vitro* se requieren condiciones asépticas. En el medio ambiente existen microorganismos que pueden crecer accidentalmente en los medios de cultivo. En las muestras de lesiones también están presentes microorganismos que eventualmente contaminan el cultivo, estos pueden ser los que generalmente causan infección secundaria o los que forman la flora natural de la

piel. Tanto los ambientales como los de la lesión tienen un efecto negativo, ya que inhiben el desarrollo normal del organismo en el cultivo al crearse la competencia por los nutrientes.

Una técnica aséptica intenta eliminar estos microorganismos contaminantes oportunistas. Esto requiere de limpieza de manos y uso de guantes. Asimismo, el equipo debe estar estéril pudiéndose usar varios métodos como, por ejemplo, calor (horno), calor + humedad relativa alta y presión (autoclave), radiación (rayos X, UV, gama) o compuestos químicos (óxido de etileno, antibióticos). Sin embargo, a pesar de que los medios de cultivo estén estériles, puede darse contaminación por la exposición al medio ambiente, siendo ésta, resultante del manejo prolongado. Por esta razón es necesario utilizar otros recursos. Tal es el caso de los antibióticos que se añaden a medios de cultivo para evitar o reducir el crecimiento de hongos y bacterias, mientras que permiten el crecimiento del organismo en estudio.

Los antibióticos se definen como sustancias químicas producidas por microorganismos de diversas especies, los cuales reprimen la proliferación de otros organismos y en

muchos casos los destruyen. Estas sustancias presentan diferencias considerables en sus propiedades químicas, físicas y farmacológicas, en el espectro antibacteriano y en el mecanismo de acción (Goodman y Gilman 1980).

Las propiedades que se buscan en el antibiótico ideal son dos: que la actividad antimicrobiana sea selectiva y eficaz y que su acción sea bactericida y no bacteriostática. El resultado primordial de la actividad antibiótica se traduce en un retraso del desarrollo bacteriano. Cuando su concentración es lo suficientemente elevada, algunos antibióticos matan las bacterias tanto *in vivo* como *in vitro* (Goodman y Gilman 1980).

Los antibióticos actuales pueden clasificarse en varios grupos tomando como base su mecanismo de acción: 1) antibióticos que inhiben la síntesis de la membrana de la célula bacteriana (ej: penicilinas), 2) agentes que modifican la permeabilidad de la membrana celular (ej: los agentes antimicóticos de polieno, nistatina y anfotericina), 3) agentes que inhiben principalmente la síntesis de proteínas por sus efectos sobre los ribosomas (ej: aminoglucósidos), 4) agentes que afectan el metabolismo del ácido nucleico (ej: rifampina) y 5) antimetabolitos

(ej: sulfonamidas). Aunque esta clasificación parece valedera en la actualidad fundándose en los datos disponibles, quizá necesite modificarse al reunir datos más definitivos. Además, aún no se ha dilucidado el mecanismo general de acción de algunos agentes (Goodman y Gilman 1980)

La penicilina es uno de los antibióticos más importantes. Este antibiótico es todavía el más extensamente usado para el tratamiento de la infección. Hay varios factores que influyen en la actividad de la penicilina y que tienen importancia en terapéutica, en el bioensayo y en la determinación de la sensibilidad de las bacterias. La estabilidad del antibiótico influye evidentemente en la potencia. Las variaciones en la composición del medio de cultivo influyen poco en la potencia del medicamento determinada *in vitro*. La mayoría de los componentes de los tejidos, la sangre y el pus, no estorban en grado notable. No se conoce ningún antagonista estructural de la penicilina. El antibiótico es mucho más activo contra bacterias, principalmente grampositivas, en la fase logarítmica de proliferación y no tiene ningún efecto sobre microorganismos en la fase de rezago (Goodman y Gilman 1980).

Los antibióticos aminoglucósidos como la estreptomicina, gentamicina y kanamicina son drogas que contienen aminoazúcares en enlace glucosídico. Estos se utilizan casi exclusivamente para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas (Goodman y Gilman 1980).

Comúnmente se añaden agentes antibacteriales a cultivos de *Leishmania* para reducir el riesgo de contaminación por bacterias. Con frecuencia se utiliza penicilina y un aminoglucósido, ya sea gentamicina o estreptomicina. A pesar del gran uso de los agentes antibacteriales, se conoce poco acerca del grado al cual diferentes concentraciones pueden inhibir el crecimiento de *Leishmania* (Navin y Pearson 1987).

En realidad no existe mucha información sobre cuál es el antibiótico más apropiado y su concentración óptima. Únicamente existen datos de cómo han sido utilizados en experimentos, pero no hay estudios comparativos. Por ejemplo, se obtuvieron promastigotes de *Leishmania tropica* de cultivos en la fase logarítmica y los inocularon en medio fresco a una concentración de 1×10^5 promastigotes por ml. El medio utilizado fue medio 199 con sales Earle

balanceadas, 20% de FCS (fetal calf serum o suero fetal de ternero) inactivado caliente, 12 mM Hepes (N-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid), 20 mM L-glutamina y penicilina-estreptomicina (50 ug/ml) (Sacks y Perkins 1984). Por otro lado, se mantuvo el parásito de leishmaniasis cutánea por pase en ratones BALB/i, seguido de pase *in vitro* en medio de insecto Grace (GIBCO). El medio Grace fue suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 ug/ml), gentamicina (50 ug/ml) y 20% de suero fetal de ternero. Se encontró que el crecimiento en este medio es comparable con el medio sobrenadante difásico de sangre de conejo (Hill et al. 1983). En otro ejemplo, se agregó a su medio de crecimiento penicilina (100 IU/ml) y estreptomicina (100 ug/ml) al momento de inoculación para proteger al parásito en crecimiento de la contaminación accidental por bacterias (Chaudhuri et al. 1982).

Agentes antibacteriales, usualmente penicilina-estreptomicina, han sido desde hace tiempo aditivos rutinarios en medios de aislamiento para evitar el crecimiento de contaminantes. El uso de antimicóticos para prevenir la contaminación por hongos parece ser que se evitaba porque se creía que eran dañinos para los parásitos,

ya que también son organismos eucariotas (Palomino et al. 1983).

Como puede verse, no existe un patrón generalizado de la utilización de antibióticos, y parece ser que cada investigador lo utiliza a su conveniencia. El cultivo de *Leishmania* en laboratorio es importante tanto para el diagnóstico como para la investigación de la enfermedad. Por eso, en el presente trabajo se evaluaron 5 agentes antimicrobiales en cultivo de *Leishmania in vitro* para ver cuál permite un crecimiento satisfactorio (sin contaminantes) y así poder dar alguna recomendación.

II MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron cuatro antibióticos y un antimicótico: penicilina, gentamicina, estreptomina, amikacina y 5-FC (5-fluorocitosina). Cada uno se probó a cuatro diferentes concentraciones (0, 50, 100 y 200 ug/ml), utilizando tres cepas de *Leishmania braziliensis*. El medio en donde se mantuvieron éstas es Evans-Schneider (Evans con agar + sangre como inclinado y Schneider + suero fetal de ternero como sobrenadante).

Se utilizó Evans-Schneider porque era el medio disponible y el recomendado por Medical Entomology Research and Training Unit (MERTU). Se agregó medio de Schneider como sobrenadante para obtener un medio más nutritivo y porque se ha demostrado que el medio Schneider de *Drosophila* (GIBCO) mas 30% de suero fetal de ternero inactivado caliente y antibióticos es más efectivo que el medio NNN (Novy Nicolle MacNeal) difásico para el aislamiento primario de leishmaniasis cutánea de seres humanos. Además, los promastigotes se pueden ver ocasionalmente después de sólo 18 horas de la inoculación a causa de la gran sensibilidad del medio Schneider (Chaves et al. 1982).

Procedimiento:

A. Obtención de las cepas.

Las cepas utilizadas fueron tres, con cada una se hizo un experimento por separado. Estas son:

- (1) *L. braziliensis ssp.*, subespecie no determinada
- (2) *L. braziliensis braziliensis*
- (3) *L. braziliensis braziliensis*

Las primeras dos se obtuvieron de cultivos inoculados con parásitos de las lesiones de pacientes (soldados que en algún momento residieron en el departamento de El Petén, Guatemala en donde adquirieron la infección) y se mantuvieron en medio Evans-Schneider. Estas fueron proporcionadas por el personal de MERTU de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG). La tercera se obtuvo de un cultivo hecho de una lesión de hamster (*Mesocricetus auratus*) de laboratorio que había sido inoculado 123 días atrás. Esta se mantuvo también en medio Evans-Schneider y fue proporcionada por Teresa Samayoa, de la UVG.

La especie de cada cepa fue determinada por el método de sonda de DNA marcada con fósforo 32, usando como cepas de referencia *L. braziliensis guayanensis* (WR677) y *L. mexicana*

mexicana (L11) (Mérida et al. 1987). La subespecie fue determinada por el análisis de 9 isoenzimas, usando como referencia lisados de cepas provenientes de la OMS. Las cepas marcadas eran *L. donovani chagasi*, *L. mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* y *L. b. panamensis* (Navin et al. 1988). La información resultante de estos procedimientos fue proporcionada por MERTU (Ver CUADRO # 1).

CUADRO # 1

Determinación de tres cepas de *Leishmania* hasta subespecie por el método de sonda de DNA y por el método de isoenzimas.

CEPA	ESPECIE (según DNA)	SUBESPECIE (según isoenzimas)
1	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis ssp.*</i>
2	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis braziliensis</i>
3	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis braziliensis</i>

* De esta cepa se compararon solamente 3 isoenzimas, por lo que no fue posible determinar hasta subespecie.

Se hicieron 3 experimentos por separado (una cepa cada vez). En cada uno se probó en duplicado 4 concentraciones y 5 antibióticos, teniendo un total de 120 tubos (40 en cada experimento). Por conveniencia, se le llamó a la cepa 1 subespecie #1 y a las cepas 2 y 3 (juntas) subespecie #2.

B. Preparación del medio.

* Para el inclinado o fase sólida:

- Base de Evans:

Por cada litro de agua destilada, se agregó 3 g extracto de carne de res (Oxoid Lab-Cemco L-29 Lot. 319), 5 g peptona bacteriológica (Oxoid L-37 Lot. 293), 8 g NaCl (Sigma Chemical Company Lot. 24F-0065) y 20 g agar purificado (DIFCO).

El medio preparado se dividió en alícuotas de 80 ml. Estas se esterilizaron a 121 grados centígrados por 15 minutos aproximadamente.

La base que no se utilizó el mismo día de preparación, se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se refrigeró a 4 grados centígrados por un máximo de 60 días. El día de utilización, se calentó la base y ya fundida se mezcló con

sangre defibrinada. La base que sí se utilizó el día de preparación, se dejó enfriar hasta 56 grados centígrados aproximados y luego se mezcló con sangre defibrinada.

- Sangrado del conejo:

La sangre se extrajo directamente del corazón de un conejo con una jeringa estéril y se defibrinó por agitación con perlas de vidrio.

Se llenaron los tubos de ensayo estériles con el Evans-sangre en alícuotas de 2 ml en cada uno y se inclinaron hasta que se enfriaran. Cuando solidificó el medio, se incubaron a 27 grados centígrados por 48 horas. Se descartaron los que mostraron algún tipo de crecimiento y los que pasaron la "prueba de esterilidad" se refrigeraron a 4 grados centígrados hasta el día de su uso o por un máximo de 60 días o un poco más.

* Para el sobrenadante o fase líquida:

- Schneider:

El medio de Schneider se hizo de preferencia el día de su utilización, en la siguiente relación: 79% de Schneider (GIBCO) en solución (ver Apéndice II), 20% de FCS (fetal calf serum o suero fetal de ternero) y 1% del antibiótico control (penicilina 0.1 mg/ml).

C. Preparación de los antibióticos.

* Compuestos químicos:

1. Penicilina G potásica amortiguada
Pfizerpen, Pfizer Pfipharmecs
2. Amikacina No. A-3650
Sigma Chemical Company Lot. 26F-0442
3. Sulfato de gentamicina No. G-3632
Sigma Chemical Company Lot. 85F-0053
4. Sulfato de estreptomina Lot. S-6501
Sigma Chemical Company Lot. 96F-0036
5. 5-Fluorocitosina No. F-7129
Sigma Chemical Company Lot. 35F-4022

Las concentraciones stock de los antibióticos se hicieron preferiblemente el día de uso, en caso contrario se congelaron a -70 grados centígrados por un máximo de 60 días.

Como 50 ul de solución de antibiótico se agregaba a 1000 ul de medio, se hicieron concentraciones stock (3 para cada antibiótico) 20 veces más concentradas que la concentración final (en el tubo):

CONCENTRACION STOCK	CONCENTRACION FINAL
1 mg/ml	50 ug/ml
2 mg/ml	100 ug/ml
4 mg/ml	200 ug/ml

Se hicieron las soluciones stock para cada antibiótico con agua destilada, se esterilizaron por filtración (MILLEX-GV 0.22 um, MILLIPORE) y se guardaron en alícuotas de 1 ml en frasquitos estériles para congelar.

D. Inoculación, crecimiento y medidas.

En cada experimento, los promastigotes aislados se inocularon a una concentración aproximada de 1×10^4 en los tubos ya preparados. Los tubos sembrados se mantuvieron en una incubadora cuyo rango de temperatura fue 22-26 grados centígrados.

El crecimiento de población en cada tubo se determinó por conteos diarios de la concentración de promastigotes, es decir número de promastigotes viables por ml de sobrenadante. Estos se iniciaron al tercer día de la inoculación y terminaron al vigésimo tercero. El criterio de viabilidad que se utilizó fue la presencia de movimiento

flagelar en el organismo.

Para los conteos, se tomó una gota de sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril y se colocó en un hemocitómetro Neubauer (American Optical) y se observó en un microscopio binocular a un aumento de 450X. Cada organismo observado representa una concentración de 1×10^4 prom./ml. de medio. Cuando el número de promastigotes era tan alto que dificultaba el conteo, se hicieron diluciones con PBS (phosphate buffered saline o solución amortiguada con sales fosfatadas). Generalmente, si la concentración estaba entre 1×10^6 y 1×10^7 se tomó un volumen de sobrenadante por cada 10 de PBS (proporción 1:10) y si la concentración era mayor de 1×10^7 la proporción se hizo 1:100. Se colocó una gota de la dilución en el hemocitómetro, se contó de forma regular y el dato obtenido se multiplicó por el valor de corrección (10 ó 100 dependiendo de la dilución).

Con los datos de los conteos se sacaron medidas de tendencia central (media y mediana) y se trazaron curvas que muestran el crecimiento de *Leishmania* bajo distintas condiciones.

III RESULTADOS

Antes del análisis estadístico, los conteos diarios de promastigotes se registraron mediante gráficas de concentración (promastigotes/ml de medio) versus tiempo (días). Se hizo una gráfica por cultivo. Luego las gráficas se agruparon según lo que se quería demostrar. Por ejemplo, la Figura 1 muestra el crecimiento promedio de la subespecie 1 o *L. braziliensis ssp.* (línea continua) y de la subespecie 2 o *L. b. braziliensis* (línea discontinua). Es importante recordar que la subespecie 1 está formada por la cepa (1) y la subespecie 2 está formada por las cepas (2) y (3). Esto se hizo por conveniencia, ya que las cepas (2) y (3) fueron determinadas como la misma subespecie y la cepa (1) no fue determinada hasta subespecie. Para trazar las líneas de la Figura 1, se promediaron los valores de cada día y de cada subespecie, sin tomar en cuenta el antibiótico o la concentración. Se puede observar que las curvas varían en sus valores (la subespecie 2 alcanzó valores más altos que la 1) pero la tendencia es la misma.

En las Figuras 2 a 6, se muestra el crecimiento de *L. braziliensis* (sin tomar en cuenta la subespecie) bajo el

efecto de cada antibiótico (uno en cada figura) y sus respectivas concentraciones. La diferencia entre estas Figuras y la Figura 1 es que en estas cinco, se utilizó medianas en vez de medias (o promedios) como en la primera. Tanto las medianas como las medias son medidas de tendencia central. La razón de utilizar medianas es para demostrar que en algunos casos la concentración de promastigotes fue menor o igual a 1×10^4 . Si se hubiera utilizado medias o promedios, el valor se hubiera redondeado a un valor más alto y por lo tanto no se detectaría en las gráficas. En la Figura 1 sí se utilizaron medias, porque el propósito de la gráfica es demostrar únicamente el crecimiento de las subespecies en una curva más uniforme, para así observar más claramente la tendencia del crecimiento. Las Figuras 2 a 6 son más irregulares que la 1, pero también muestran cierta tendencia. Los valores correspondientes a las Figuras 2 a 6 se encuentran en los Cuadros III-7 y III-8 del Apéndice III.

Los parámetros de las curvas de crecimiento que se tomaron en cuenta para evaluar las variables antibiótico, concentración y subespecie son:

-PICO o concentración máxima alcanzada, que está expresado en número de promastigotes viables por mililitro de medio.

-DMAX o día en que se da el PICO, que está expresado en número de días que tarda en darse la concentración máxima, contados a partir del día de inoculación.

-DIA6 o período en que se da una concentración mayor o igual a 1×10^6 , que está expresado en cantidad de días sean éstos consecutivos o no.

-DIA16 o día en que se da una concentración mayor o igual a 1×10^6 por primera vez, que está expresado en número de días contados a partir del día de inoculación.

Con los valores de estos parámetros, sacados de la curva de crecimiento trazada para cada cultivo, se hicieron Análisis de Varianza (ANDEVA) Trifactoriales. En cada uno se comparó un parámetro (PICO, DMAX, DIA6 o DIA16) contra cada variable (antibiótico, concentración y subespecie). Así, en el Cuadro 2, se presenta la comparación de PICO o concentración máxima versus cada antibiótico, cada concentración y cada subespecie. También se presentan las interacciones de doble vía posibles entre las variables y la

interacción triple. Si los valores de la última columna (significancia de F o p) son menores que .050 ($p < .050$), la fuente de variación resulta significativamente diferente. En el Cuadro 2 sólo subespecie (F=82.408, $p < .050$) muestra diferencia significativa en cuanto a concentración máxima alcanzada, en donde la subespecie 2 o *L. b. braziliensis* tiene los valores más altos (ver Figura 1).

En el Cuadro 3 se presenta la comparación de (DMAX) o el día en que se da la concentración máxima versus cada variable y las interacciones de doble y triple vía entre variables. En este cuadro, subespecie (F=55.157, $p < .050$) de nuevo resulta significativamente diferente. La subespecie 1 o *L. braziliensis ssp.* tarda más días en obtener su concentración máxima, lo que la hace estadísticamente diferente a la subespecie 2 o *L. b. braziliensis*.

En el Cuadro 4 se presenta la comparación de (DIA6) o período que se da una concentración mayor o igual a 1×10^6 versus cada variable y las interacciones correspondientes entre variables. Otra vez la fuente de variación subespecie

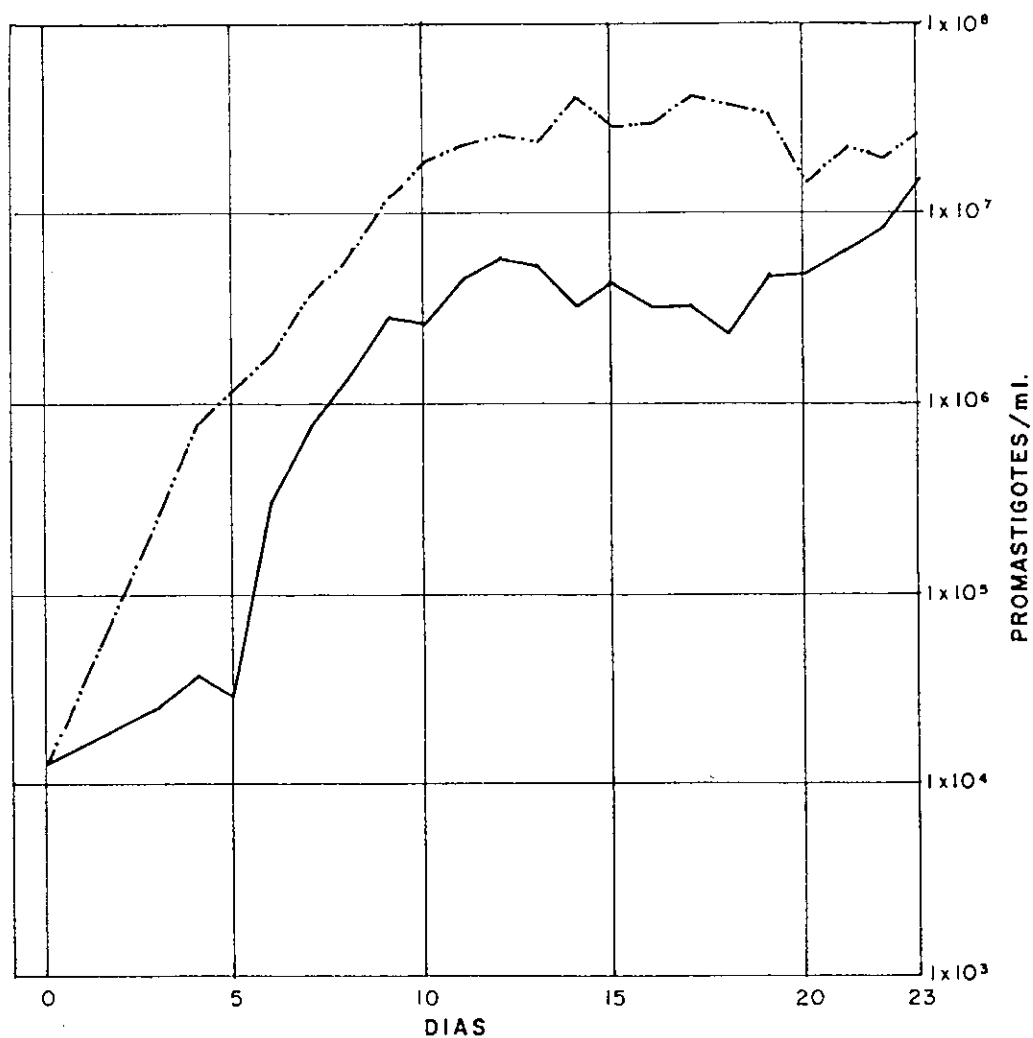
($F=30.124$, $p < .050$) es significativamente diferente. Al sacar los promedios, *L. b. braziliensis* (14 días) tiene un periodo más largo que *L. braziliensis ssp.* (12 días). En este mismo cuadro, la interacción antibiótico-subespecie ($F=3.059$, $p = .022$) tiene diferencia significativa. Esto indica que hay una o más combinaciones antibiótico-subespecie que muestra o muestran un mejor crecimiento en cuanto al parámetro DIA6. Como son cinco antibióticos hay que hacer una comparación múltiple (Prueba de Tukey) para verificar cuál o cuáles combinaciones son significativamente diferentes (Zar 1984). El resumen de esta prueba para la interacción antibiótico-subespecie del Cuadro 4 se muestra en el Cuadro 5. La mejor combinación resultante es la de penicilina y *L. b. braziliensis*, que mostró el mejor promedio para el parámetro medido. La combinación más significativamente diferente a la antes mencionada es gentamicina y *L. braziliensis ssp.* Las demás combinaciones son intermedias.

En el Cuadro 6 se presenta la comparación de (DIA16) o día en que se da una concentración de 1×10^6 por primera vez versus cada variable y las interacciones correspondientes. La fuente de variación subespecie ($F=20.836$, $p < .050$) es significativamente diferente. Al ver los promedios en días de las subespecies, *L. b. braziliensis* (10 días) resulta alcanzar la concentración mencionada en menos días que *L. braziliensis ssp.* (12 días). En este mismo cuadro, hay dos interacciones que tienen diferencias significativas. Una es antibiótico-subespecie ($F=4.016$, $p < .050$). En el Cuadro 7 se puede ver que la mejor combinación es penicilina y *L. b. braziliensis* que muestra el promedio más bajo (para el parámetro medido es lo más conveniente) y la más diferente a ésta es gentamicina *L. braziliensis ssp.* Las demás combinaciones son intermedias. La otra interacción es concentración-subespecie ($F=4.068$, $p = .010$). En el Cuadro 8 se puede ver que la mejor combinación es 100 ug/ml y *L. braziliensis ssp.* y la más diferente a ésta es 100 ug/ml. Las demás combinaciones son intermedias.

En el Cuadro 9 se muestra la contaminación resultante de cada experimento y la contaminación que se obtuvo en

forma global. Siete tubos de 120 fueron descartados, de éstos cinco eran controles (concentración antimicrobial = 0 ug/ml). Esto sugiere que los agentes antimicrobiales sí benefician al cultivo, previniendo la contaminación.

**CRECIMIENTO DE DOS SUBESPECIES DE
LEISHMANIA BRAZILIENSIS
EN MEDIO EVANS - SCHNEIDER**



SIMBOLOGIA

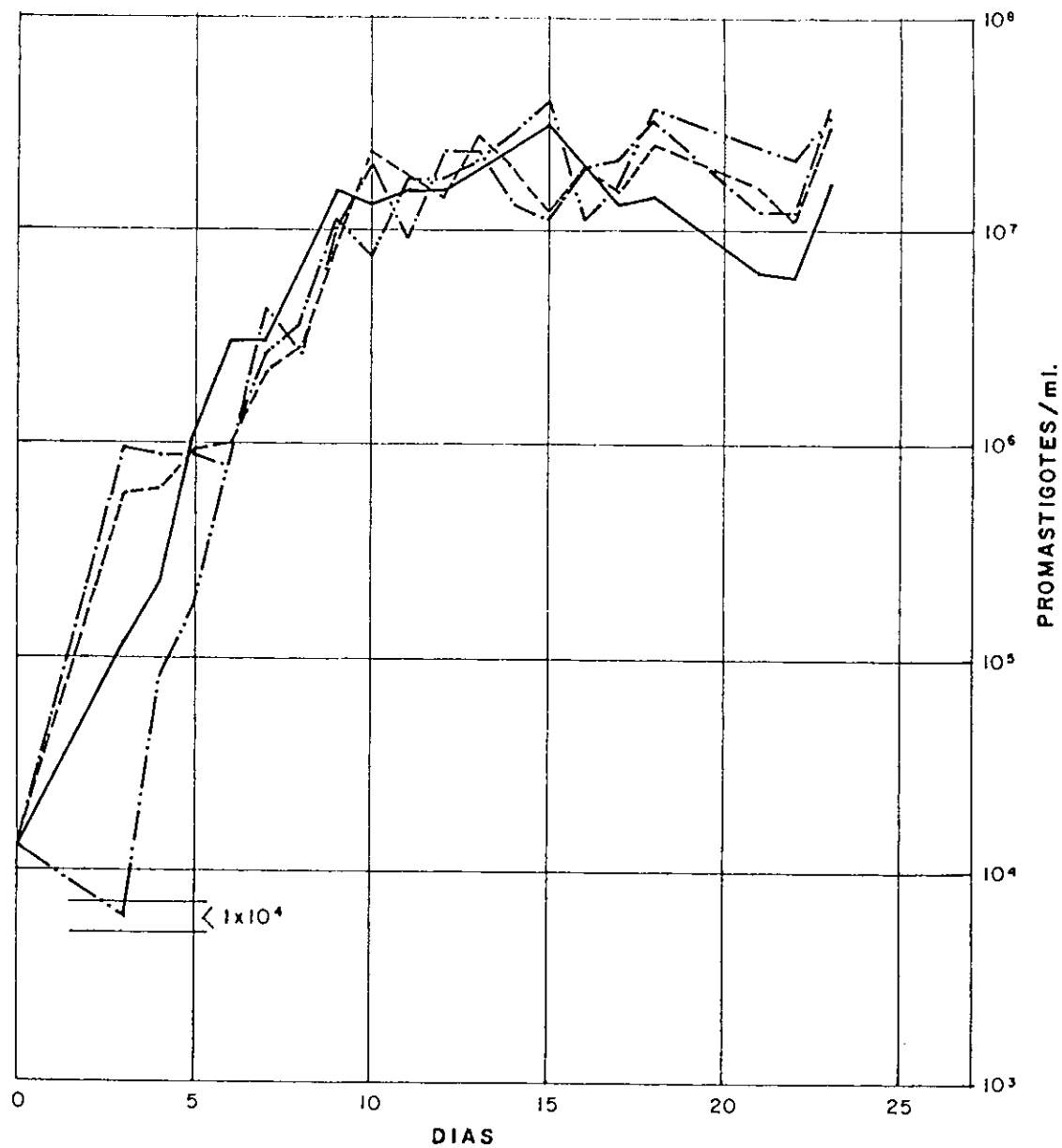
- L. BRAZILIENSIS S.P.
- · - · - · - L. BRAZILIENSIS BRAZILIENSIS

BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FIGURA 1

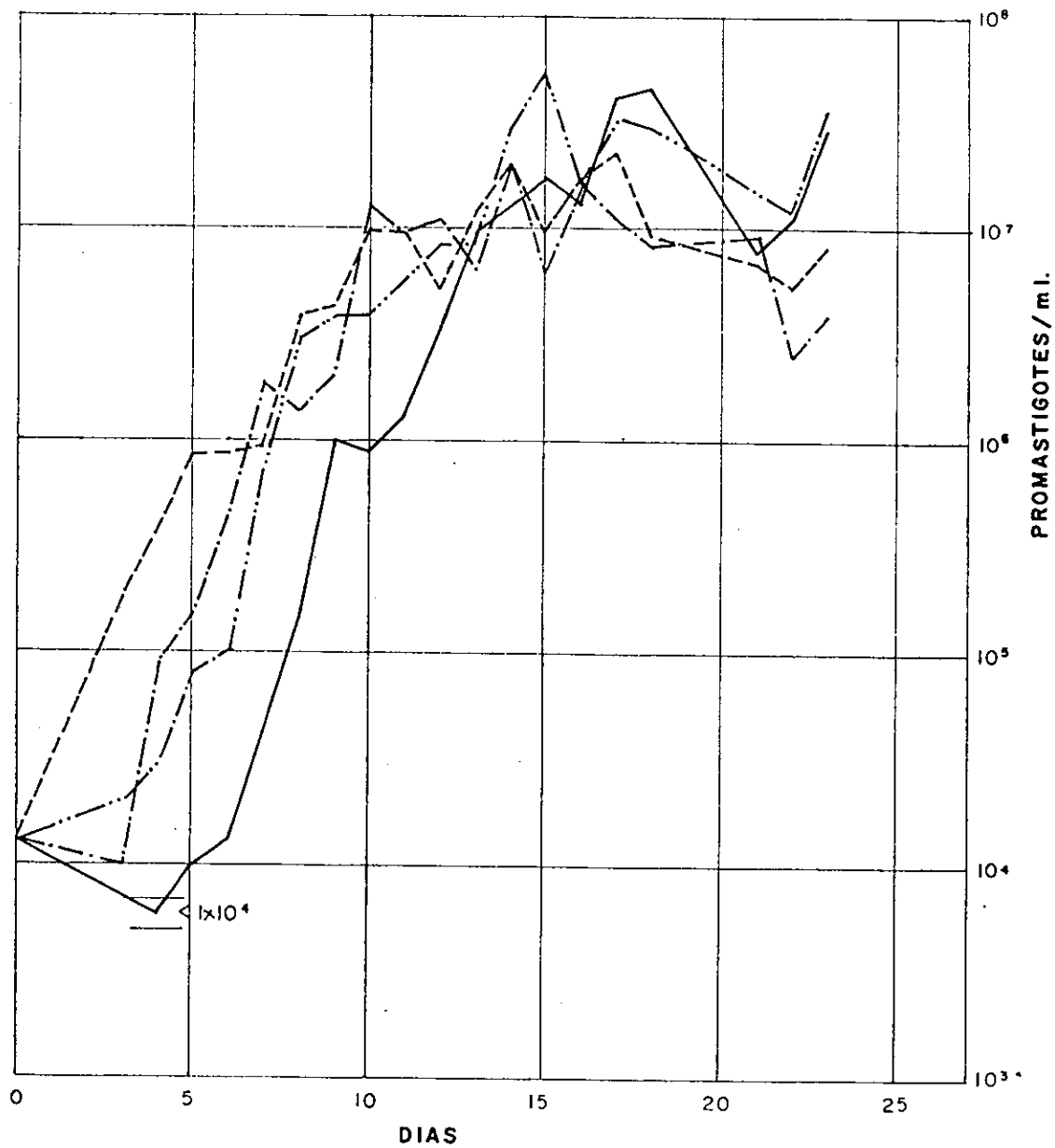
EFFECTO DE PENICILINA EN EL CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA BRAZILIENSIS
EN MEDIO EVANS-SCHNEIDER



SIMBOLOGIA

- 0 ug/ml. = CONTROL
- - - 50 ug/ml.
- · - · 100 ug/ml.
- · · 200 ug/ml.

**EFFECTO DE GENTAMICINA EN EL CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA BRAZILIENSIS
EN MEDIO EVANS - SCHNEIDER**

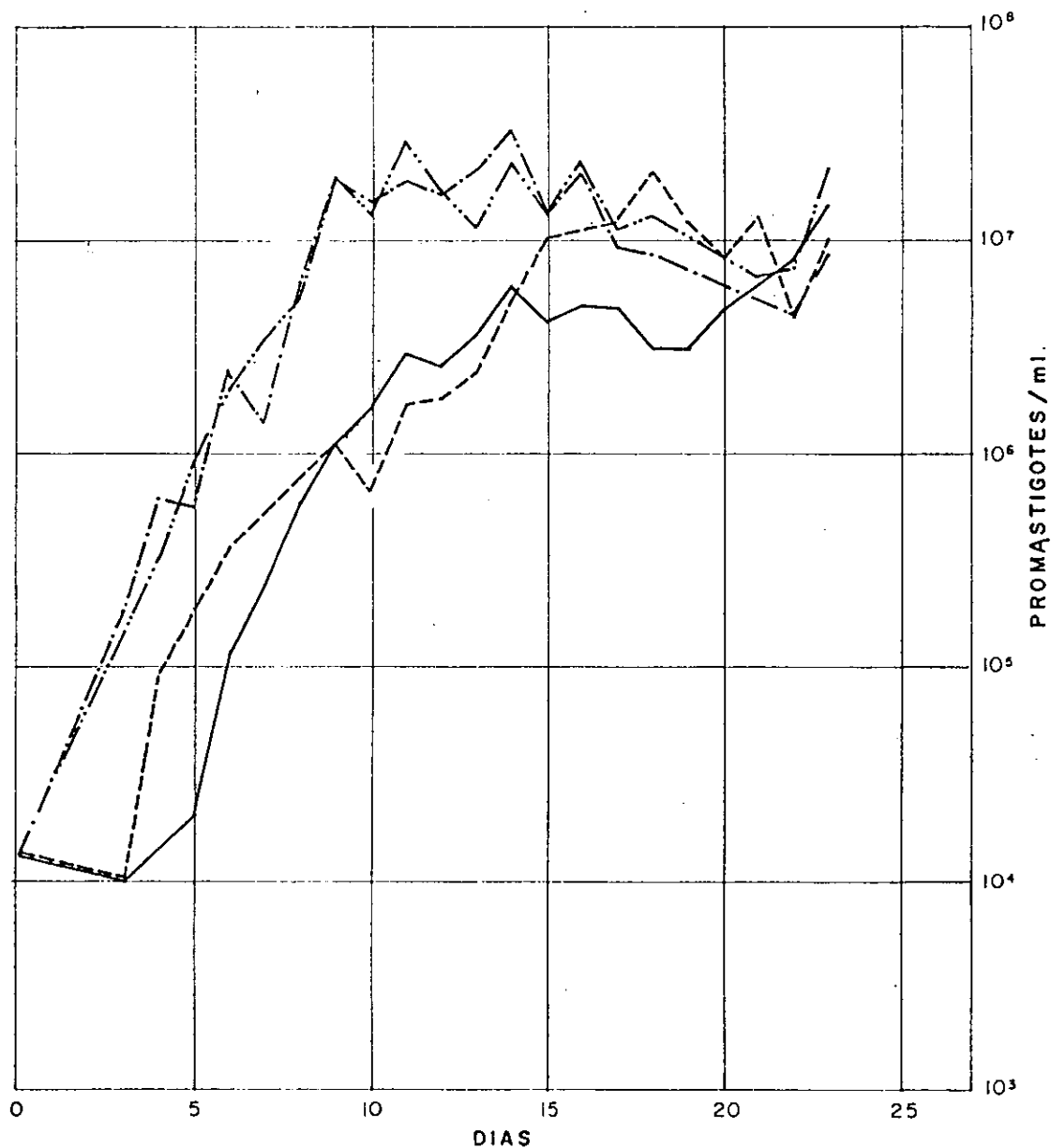


SIMBOLOGÍA

- 0 ug/ml. = CONTROL
- 50 ug/ml.
- . - . - . 100 ug/ml.
- 200 ug/ml.

FIGURA 3

**EFFECTO DE ESTREPTOMICINA EN EL CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA BRAZILIENSIS
EN MEDIO EVANS - SCHNEIDER**

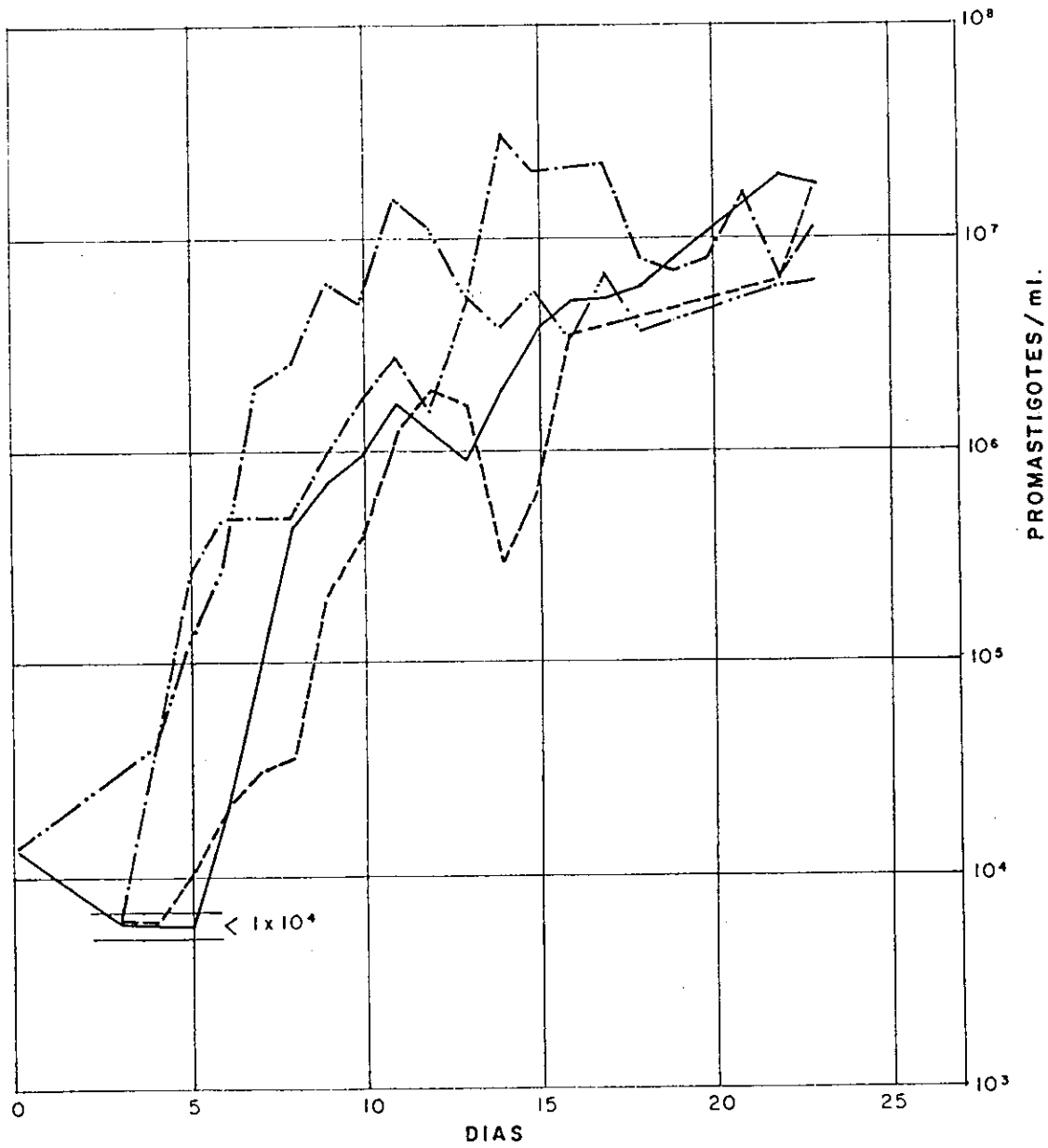


SIMBOLOGIA

- 0 ug/ml. = CONTROL
- - - - - 50 ug/ml.
- . - . - 100 ug/ml.
- . . . - 200 ug/ml.

FIGURA 4

**EFFECTO DE AMIKACINA EN EL CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA BRAZILIENSIS
EN MEDIO EVANS-SCHNEIDER**

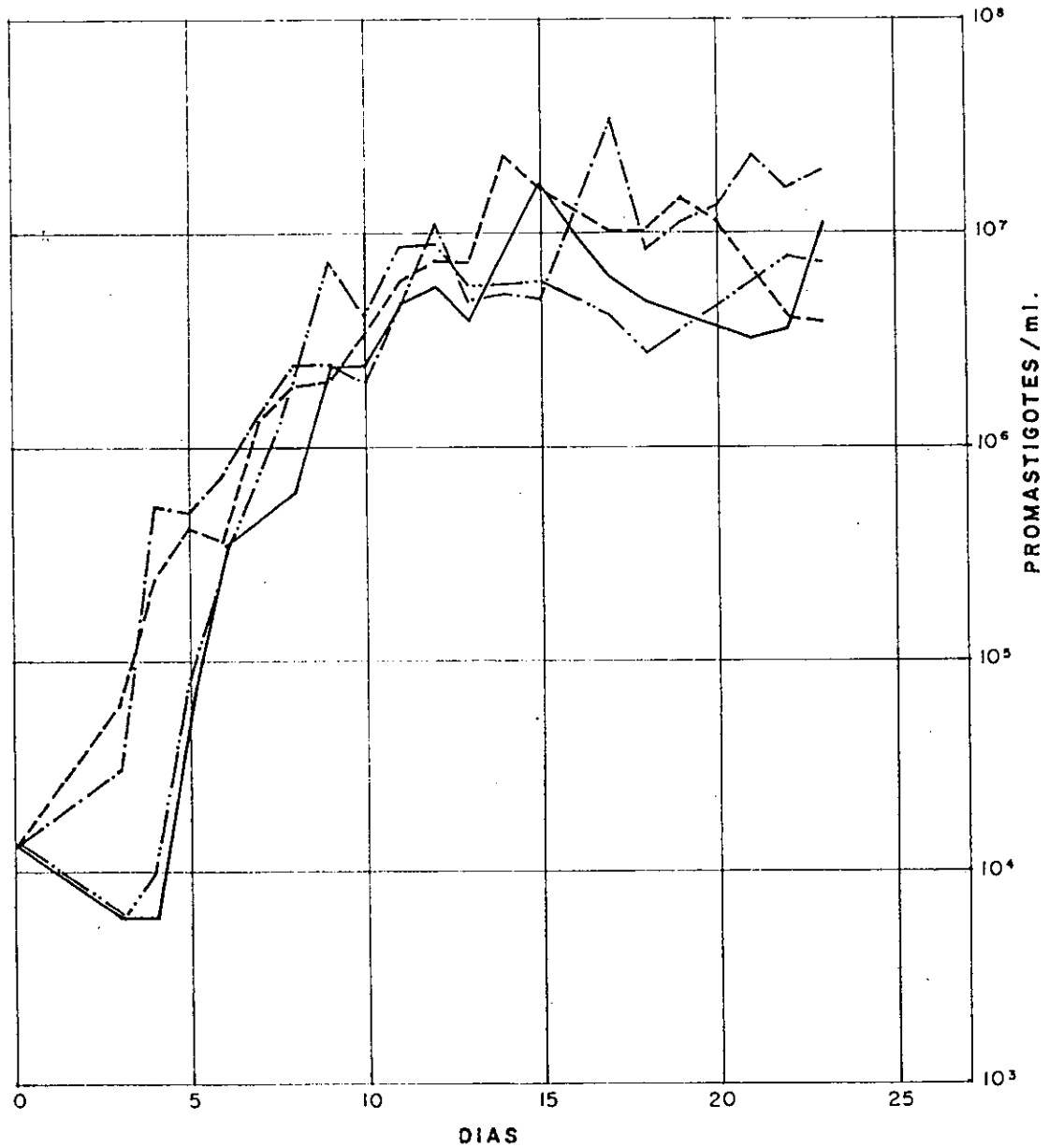


SIMBOLOGIA

- 0 ug/ml. = CONTROL
- - - - - 50 ug/ml.
- . - . - 100 ug/ml.
- . . . - 200 ug/ml.

FIGURA 5

**EFFECTO DE 5-FLUOROCITOSINA EN EL CRECIMIENTO DE
LEISHMANIA BRAZILIENSIS
EN MEDIO EVANS-SCHNEIDER**



SIMBOLOGIA

- 0 ug/ml. = CONTROL
- - - - - 50 ug/ml.
- · - · - 100 ug/ml.
- · · · - 200 ug/ml.

FIGURA 6

CUADRO # 2

Análisis Trifactorial de varianza para la concentración máxima de promastigotes alcanzada comparada con antibiótico, concentración y subespecie. $p = .050$

PICO (Concentración máxima de promastigotes alcanzada)
por ANTIBIOTICO
CONCENTRACION
SUBESPECIE

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F	p
Antibiótico	42076610.290	4	10519152.572	1.306	.276
Concentración	6709482.440	3	2236494.147	.278	.841
Subespecie	663707048.879	1	663707048.900	82.408	.000*
Interacción					
Anti-Conc	104971108.181	12	8747592.386	1.086	.384
Anti-Subesp	6089918.164	4	1522479.541	.189	.943
Conc-Subesp	1171442.330	3	390480.777	.048	.986
Anti-Conc-Subesp	56346666.570	12	4695555.548	.583	.849
Explicado	885261194.288	39	22699004.982		
Residual	604045361.833	75	8053938.158		
Total	1489306556.12	114	13064092.598		

* = Valor menor que .050, estadísticamente significativo.

CUADRO # 3

Análisis trifactorial de varianza para el día en que se obtuvo la concentración máxima de promastigotes comparada con antibiótico, concentración y subespecie $p = .050$

por DMAX (Día en que se da la concentración máxima de promastigotes)
 ANTIBIOTICO
 CONCENTRACION
 SUBESPECIE

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F	p
Antibiótico	89.248	4	22.312	1.182	.326
Concentración	95.010	3	31.670	1.677	.179
Subespecie	1041.616	1	1041.616	55.157	.000 *
Interacción					
Anti-Conc	140.430	12	11.703	.620	.819
Anti-Subesp	83.784	4	20.946	1.109	.359
Conc-Subesp	127.419	3	42.473	2.249	.090
Anti-Conc-Subesp	146.559	12	12.213	.647	.796
Explicado	1723.232	39	44.185		
Residual	1416.333	75	18.884		
Total	3139.565	114	27.540		

* = Valor menor que .050, estadísticamente significativo.

CUADRO # 4

Análisis trifactorial de varianza para el período en que se mantiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 expresado en días comparado con antibiótico, concentración y subespecie. $p = .050$

por DIA6 (Día en que se tiene una concentración mayor o igual a 1×10^6)
 ANTIBIOTICO
 CONCENTRACION
 SUBESPECIE

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F	p
Antibiótico	140.142	4	35.035	1.504	.210
Concentración	16.949	3	5.650	.243	.866
Subespecie	701.718	1	701.718	30.124	.000 *
Interacción					
Anti-Conc	229.993	12	19.166	.823	.627
Anti-Subesp	284.993	4	71.248	3.059	.022 *
Conc-Subesp	157.652	3	52.551	2.256	.089
Anti-Conc-Subesp	220.764	12	18.397	.790	.659
Explicado	1742.447	39	44.678		
Residual	1747.083	75	23.294		
Total	3489.530	114	30.610		

* = Valor menor que .050, estadísticamente significativo.

CUADRO # 5

Resultados de la Prueba de Tukey de la interacción antibiótico-subespecie para el período en que se mantiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 .

ANTIBIOTICO-SUBESPECIE	PROMEDIO # DE DIAS	(*)
Penicilina-L. b. braziliensis	18.81	a
Gentamicina-L. b. braziliensis	18.19	a b
Estreptomycin-L. b. braziliensis	17.07	a b c
5-FC-L. braziliensis ssp.	15.38	a b c d
5-FC-L. b. braziliensis	15.25	a b c d
Amikacina-L. b. braziliensis	14.73	a b c d
Penicilina-L. braziliensis ssp.	12.63	b c d e
Estreptomycin-L. braziliensis ssp.	11.25	c d e
Amikacina-L. braziliensis ssp.	10.57	d e
Gentamicina-L. braziliensis ssp.	7.71	e

(*) NOTA: Los promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p=0.05$). El promedio más alto representa la mejor combinación.

CUADRO # 6

Análisis trifactorial de varianza para el día en que se alcanza por primera vez una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 comparado con antibiótico, concentración y subespecie. $p = .050$

DIA16 (Día en que se da una concentración mayor o igual a 1×10^6 por primera vez)
 por ANTIBIOTICO
 CONCENTRACION
 SUBESPECIE

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F	p
Antibiótico	68.574	4	17.144	1.091	.367
Concentración	43.700	3	14.567	.927	.432
Subespecie	327.316	1	327.316	20.836	.000 *
Interacción					
Anti-Conc	234.958	12	19.580	1.246	.269
Anti-Subesp	252.368	4	63.092	4.016	.005 *
Conc-Subesp	191.734	3	63.911	4.068	.010 *
Anti-Conc-Subesp	253.368	12	21.114	1.344	.213
Explicado	1362.825	39	34.944		
Residual	1178.167	75	15.709		
Total	2540.991	114	22.289		

* = Valor menor que .050, estadísticamente significativo.

CUADRO # 7

Resultados de la Prueba de Tukey de la interacción antibiótico-subespecie para el día en que se alcanza por primera vez una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 .

ANTIBIOTICO-SUBESPECIE	PROMEDIO # DE DIAS	(*)
Gentamicina-L. braziliensis ssp.	14.00	a
Penicilina-L. braziliensis ssp.	10.63	a b
Amikacina-L. braziliensis ssp.	10.29	a b c
Estreptomycin-L. braziliensis ssp.	10.00	a b c
Amikacina-L. b. braziliensis	8.53	b c
5-FC-L. b. braziliensis	8.31	b c
5-FC-L. braziliensis ssp.	7.25	b c
Estreptomycin-L. b. braziliensis	6.64	b c
Gentamicina-L. b. braziliensis	5.75	b c
Penicilina-L. b. braziliensis	5.00	c

(*) NOTA: Los promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p=0.05$). El promedio más bajo representa la mejor combinación.

CUADRO # 8

Resultados de la Prueba de Tukey de la interacción concentración-subespecie para el día en que se alcanza por primera vez una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 .

CONCENTRACION-SUBESPECIE	PROMEDIO # DE DIAS	(*)
100 ug/ml-L. braziliensis ssp.	12.50	a
50 ug/ml-L. braziliensis ssp.	11.20	a b
0 ug/ml-L. braziliensis ssp.	10.50	a b
0 ug/ml-L. b. braziliensis	7.84	b c
200 ug/ml-L. b. braziliensis	7.37	b c
200 ug/ml-L. braziliensis ssp.	7.20	b c
50 ug/ml-L. b. braziliensis	6.95	b c
100 ug/ml-L. b. braziliensis	5.16	c

(*) NOTA: Los promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p=0.05$). El promedio más bajo representa la mejor combinación.

CUADRO # 9

Porcentajes de contaminación en cultivos de *L. braziliensis* en medio de Evans-Schneider.

EXPERIMENTO	% CONTAMINACION INOFENSIVA BACTERIAL	% CONTAMINACION BACTERIAS	OFENSIVA HONGOS	% TUBOS DESCARTADOS
CEPA (1) (n = 40)	20.0	5.0	0.0	5.0
CEPA (2) (n = 40)	12.5	2.5	2.5	5.0
CEPA (3) (n = 40)	25.0	0.0	7.5	7.5
GLOBAL (n = 120)	19.0	2.5	3.3	5.8

NOTA: El 71.43% del total de tubos descartados pertenecía al grupo control (tubos con 0 ug/ml de agente antimicrobial).

IV DISCUSION

En resumen, *L. b. braziliensis* creció mejor que *L. braziliensis ssp.* respecto de todos los parámetros que se tomaron en cuenta: obtuvo valores más altos de concentración máxima de promastigotes, esa concentración la alcanzó más rápidamente, permaneció más días a una concentración mayor o igual a 1×10^6 y alcanzó esa concentración en menos días. La diferencia entre antibióticos y concentraciones tomados individualmente (sin interacciones) no fue significativa.

La evaluación se hizo con base en las curvas de crecimiento del parásito (bajo el efecto de los diferentes agentes y sus diferentes concentraciones). Estas se trazaron con los datos de población que se obtuvieron a través de conteos diarios. En general, en la curva de crecimiento de un microorganismo se observan varias fases: la fase lag o inicial (que a veces dura muy poco tiempo) en donde los organismos crecen en tamaño pero no se reproducen, la fase exponencial o logarítmica (log) en donde se da un crecimiento acelerado de la población, la fase estacionaria en donde se observa un paro en el crecimiento de la población (probablemente los organismos tengan un

metabolismo lento, debido a condiciones adversas o desfavorables como escasez de alimento, el tiempo de duración depende de las condiciones del cultivo y del organismo en sí) y la fase de declinación o de muerte en donde la población decrece y eventualmente desaparece.

Para cada análisis de varianza que se hizo, se tomaron en cuenta aspectos importantes en el estudio de *Leishmania* cuando se cultivan *in vitro*. Estos se dedujeron de las curvas de crecimiento. Por ejemplo, el nivel de nutrientes en el medio es el factor limitante que determina la vida del cultivo. Por esta razón, es importante saber cuál es el mayor número de promastigotes viables por mililitro de medio que un cultivo puede alcanzar y a los cuántos días del inóculo se logra. La importancia radica en que un cultivo presenta las fases antes mencionadas y que la población en el mismo está limitada por el nivel de nutrientes en el medio de cultivo. Cada cierto tiempo, dependiendo de la calidad del medio que se utilice y el tipo de organismo que se siembre, hay que llevar a cabo un pase. Este consiste en inocular un nuevo medio (o medio fresco) con una muestra del cultivo anterior. Por lo tanto, si se conocen los aspectos antes mencionados, es más factible obtener una muestra representativa del organismo (para lograr un pronto

crecimiento en el nuevo medio) y conocer el día más apropiado para obtenerla y así realizar el pase.

También es importante determinar el número de días necesarios para obtener una concentración de 1×10^6 y a los cuántos días se alcanza la misma por primera vez. Una concentración de 1×10^6 es útil cuando se quiere ver que un cultivo es positivo o se quiere hacer una estimación de la población, ya que no es un número ni muy bajo, ni muy alto que dificulte el conteo. Esta concentración también es ventajosa para el cultivo en sí, ya que en este número el organismo no sufre de tensión o "stress". Esta condición se alcanza cuando hay una población tan elevada que los nutrientes son escasos y los organismos compiten por ellos. Por otro lado, la competencia de nutrientes también se puede dar entre el organismo inoculado y organismos contaminantes como hongos y bacterias. Estos contaminantes son producto de dos fuentes principalmente: el medio ambiente y la muestra (que proviene de una lesión). En el medio ambiente existen muchos microorganismos oportunistas que penetran y crecen en los medios de cultivo que se exponen al mismo. Al hacer los conteos, el abrir y cerrar los cultivos diariamente, aumenta la probabilidad de contaminación ambiental. La muestra, como proviene de una lesión, muchas veces tiene infección

secundaria que es de donde provienen los microorganismos contaminantes. Según un estudio de Samayoa (1988), de las dos formas de toma de muestra que se utilizan (la biopsia y el aspirado), la primera provoca más contaminación. De los tres experimentos que se realizaron aquí, precisamente en el que se utilizó una muestra que provenía de una biopsia hecha a hamster se observó el mayor porcentaje de contaminación (25%) (ver Cuadro # 9).

En los cultivos se observan rosetas, cuando la concentración está arriba de 1×10^6 promastigotes por ml. Estas son agrupaciones de leishmanias, que parecen estar atraídas hacia un mismo punto. La formación de rosetas cuando se usa un medio inadecuado, o cuando el microorganismo está en la fase estacionaria de la curva de crecimiento, indica que las rosetas se forman cuando el suplemento de nutrientes es inadecuado. Se ha sugerido que el centro de una roseta está ocupado por un promastigote en degeneración, que puede actuar como fuente de nutrientes esenciales (Marín 1982). En otras palabras, cuando el número de promastigotes es muy elevado y se observan rosetas, es fácil asumir que las condiciones nutritivas del medio son deficientes y que el cultivo necesita de un pase. La presencia de rosetas también puede ser indicativo de la

fase de crecimiento en la que el parásito se encuentra. La fase que más sugiere es la estacionaria, que es previa a la de declinación.

Tomando en cuenta los aspectos que se evaluaron estadísticamente, se puede decir que la subespecie #2 o *L. b. braziliensis* creció mejor que la subespecie #1 o *L. braziliensis ssp.* Aunque la subespecie #1 fue determinada únicamente hasta especie por lo menos se puede asumir que no es *L. braziliensis braziliensis*, ya que es estadísticamente diferente a la subespecie #2. Además, observadas bajo el microscopio difieren en tamaño y la subespecie #2 resulta ser más grande que la #1, aunque no fueron medidas ya que no era de interés en el presente estudio.

En el caso de la *L. braziliensis ssp.* se hizo un solo experimento, utilizando promastigotes que habían sido mantenidos a través de pases por más de 4 meses. Grimaldi (1984) afirma que hacer muchos pases de promastigotes *in vitro* puede llevar a cambios en las características biológicas, bioquímicas e inmunológicas en el parásito. Por esta razón, el trabajo con promastigotes de *Leishmania* es mejor si se lleva a cabo con cepas que se han aislado recientemente de animales. Tomando en cuenta esta

afirmación, con *L. b. braziliensis* se hicieron dos experimentos. Uno utilizando una cepa ya aislada y mantenida por medio de pasajes y otro utilizando una cepa recién aislada de un hamster. Como no hubo diferencia en el crecimiento, los datos de ambos experimentos se tomaron como una sola muestra en el análisis estadístico (ver Cuadro # III-8, Apéndice III).

Marinkelle (1981) reporta que a su conocimiento, la variación en el crecimiento de promastigotes de diferentes *Leishmania*, en medios de cultivo distintos, no se ha usado rutinariamente para diferenciar *Leishmania* aislada de pacientes. Esto sugiere que el crecimiento de diferentes *Leishmania* puede variar según el medio de cultivo y, efectivamente, ha sido comprobado por Mayorga (1988). Para evitar la variación que diferentes medios de cultivo pudieran provocar, se utilizó el mismo medio en los tres experimentos. Entre los componentes más importantes que contiene la base (EVANS) están: glucosa como fuente de energía, peptona como fuente de aminoácidos y NaCl como estabilizador osmótico. Esta, además, fue suplementada con sangre de conejo. Además, contenía extracto de carne, que según Chaudhuri et al. (1982) posee sustancias necesarias para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania*. El

sobrenadante (SCHNEIDER) contiene aminoácidos, sales orgánicas y otros componentes (ver Apéndice II).

Respecto de antibiótico y concentración (tomándolos en cuenta de forma individual) no se observó gran diferencia, aparentemente ningún antibiótico inhibe el crecimiento de *Leishmania* a las concentraciones probadas. Si se toma en cuenta las interacciones, hubo algunas que sí dieron diferencias significativas respecto de un aspecto. Por ejemplo, respecto del período en que se mantiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 , la interacción antibiótico-subespecie resultó significativamente diferente. Si se observa de nuevo el Cuadro # 5, la deducción general es que *L. b. braziliensis* se mantuvo más días a más de 1×10^6 promastigotes/ml que *L. braziliensis* ssp. Otro ejemplo es respecto del día en que se alcanza por primera vez la concentración de 1×10^6 . Aquí, las interacciones antibiótico-subespecie y concentración-subespecie resultan significativamente diferentes. Es curioso notar aquí que una misma concentración actúe tan diferente en dos subespecies, pero hay que tomar en cuenta que no es necesariamente con el mismo antibiótico. Con estos resultados pareciera que una subespecie es más sensible que la otra, pero si se observan

las curvas de crecimiento se puede ver que tienen la misma tendencia y que se comparan con la normal. Por otro lado, estos resultados también sugieren que las subespecies tienen un comportamiento diferente de crecimiento. Es decir que una crece más que la otra (obtiene valores más altos) y no precisamente que una sea más sensible que la otra. Lainson y Shaw (1970) reportan que existen dos tipos de *L. braziliensis*, unas cepas que crecen rápido y otras cepas que crecen despacio. Esta podría ser otra posible respuesta. Lo importante de mencionar aquí es que, si se dieron algunas interacciones con diferencias significativas, pero estas son muy específicas y son respecto de un solo aspecto. En cambio, la variable subespecie cuando se toma individualmente resulta significativamente diferente en todos los aspectos evaluados. Las variables antibiótico y concentración tomadas individualmente no son estadísticamente diferentes.

A continuación se muestra como varios autores han utilizado agentes antimicrobiales en su investigación con el protozoo *Leishmania*:

- penicilina 500 IU/ml y estreptomycinina 500 ug/ml (Walton et al. 1982)
- penicilina 100 IU/ml y estreptomycinina 100 ug/ml

(Chaudhuri et al. 1982)

- penicilina 100 U/ml y estreptomina 0.1 mg/ml (Chaves et al. 1982)
- penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 ug/ml (Berman et al. 1983; Berman y Lee 1983)
- penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 ug/ml y gentamicina 50 ug/ml (Hill et al. 1983)
- penicilina 100 U/ml y estreptomina 10 ug/ml (Coombs y Baxter 1984)
- penicilina-estreptomina 50 ug/ml (Sacks y Perkins 1984)
- gentamicina 200 ug/ml y 5-fluorocitosina 100 ug/ml (Cuba Cuba 1986).

Esta lista demuestra que existe una gran variación en cuanto a cómo se utilizan los agentes antimicrobiales para reducir el riesgo de contaminación. Los antibióticos de preferencia son penicilina y estreptomina, excepcionalmente se utilizan antimicóticos como el 5-FC.

Los resultados demuestran que los criterios de selección de antibióticos o agentes deben ser esencialmente prácticos. Se recomienda como factor principal de determinación, el costo y la disponibilidad del agente y no el efecto que tenga en el cultivo de *Leishmania*

braziliensis, ya que es el mismo para los cinco casos (Ver FIGURAS 2-6). Respecto de la concentración, se da el mismo caso. El efecto de las concentraciones evaluadas para los cinco agentes no es variable, las diferencias no son significativas. Sin embargo, respecto de la contaminación registrada, los controles (0 ug/ml) fueron los más afectados, como era de esperarse.

Como ninguna concentración inhibió el crecimiento del parásito, sería necesario evaluar otras concentraciones mayores a 200 ug/ml (que fue la máxima que se probó) para averiguar la concentración mínima inhibitoria. Con los resultados obtenidos aquí, se puede asumir que la penicilina, la gentamicina, la estreptomycin, la amikacina y la 5-fluorocitosina a concentraciones de 200 ug/ml o menos no proporcionan toxicidad al cultivo de *Leishmania in vitro*. Las interacciones que resultaron significativamente diferentes son bastante específicas. Hay que tomar en cuenta que aquí se evaluaron solo dos subespecies y que al probar con varias subespecies más se podría hacer una conclusión más general.

Es importante mencionar que tales agentes fueron evaluados casi individualmente (todos fueron combinados con

una cantidad muy pequeña de penicilina que ya contenía la fase líquida del medio). Sería muy interesante y muy útil realizar la evaluación de sus posibles combinaciones (no sólo con penicilina) para averiguar cuáles tienen una acción sinérgica, dando por lo tanto un efecto aditivo y cuáles, por el contrario, poseen una acción antagónica. También sería interesante evaluar más agentes antimicrobiales y de todos tipos, es decir de diferentes mecanismos de acción.

Otro factor importante de mencionar es que únicamente se trabajó con tres cepas, de las cuales resultaron dos subespecies de *L. braziliensis* después de los análisis de DNA e isoenzimas respectivos. Lo ideal hubiera sido trabajar con un número mayor de cepas, pero el tiempo era limitado y no fue posible.

Como se mencionó en la introducción, generalmente se utiliza penicilina y un aminoglucósido. Esto se debe a que la penicilina ataca principalmente a las bacterias grampositivas y los aminoglucósidos a las bacterias gramnegativas. Entonces, si se utilizan en combinación, el espectro bacteriano que abarcan es mayor.

El porcentaje de contaminación es un factor que también

se toma en cuenta al escoger el antibiótico o antimicótico que se va a utilizar. Sin embargo, en la evaluación de estos cinco agentes no fue determinante. El porcentaje que se registró fue bastante bajo. Un factor interesante es que la mayoría de tubos que se descartaron por contaminación eran controles, o sea que no contenían agente antimicrobial. Esto lleva a la conclusión de que el uso de agentes antimicrobiales es muy útil en la prevención de bacterias u hongos y que es aconsejable utilizarlos a la concentración que más sea conveniente (según cada experimento).

En general, yo recomendaría utilizar cualquiera de los antibióticos (el más disponible) en combinación con el antimicótico para disminuir el riesgo de contaminación tanto por bacterias como por hongos. La concentración que recomendaría está entre 50 y 200 ug/ml para disminuir de manera confiable la contaminación. Hay que tomar en cuenta que, si la concentración es muy baja la acción puede ser bacteriostática y, por consiguiente, se puede crear resistencia y que el uso de concentraciones muy altas puede representar costos elevados. El costo es un factor muy importante, sobretodo, en países del tercer mundo como lo es Guatemala, en donde los recursos no son abundantes.

V CONCLUSIONES

1. Las cepas de *L. braziliensis braziliensis* y *L. braziliensis ssp.*, utilizadas en este estudio, son estadísticamente diferentes en cuanto a su crecimiento en condiciones iguales de cultivo.
2. Penicilina, gentamicina, estreptomycin, amikacina y 5-fluorocitosina pueden usarse indistintamente como agentes antimicrobiales en cultivos *in vitro* de *Leishmania braziliensis*.
3. Los agentes antimicrobiales aquí evaluados en concentraciones de 50, 100 ó 200 ug/ml (más el 0.1 ug/ml de penicilina contenida en la fase líquida del medio) no inhiben el crecimiento de *L. braziliensis* en medio Evans-Schneider.
4. Las interacciones antibiótico-subespecie y concentración-subespecie resultaron significativamente diferentes pero en forma muy específica. Esto no afectó la curva de crecimiento del parásito, por lo menos en las dos subespecies evaluadas.

VI LITERATURA CITADA

- Berman, J.D. y L.S. Lee. 1983. Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32(5):947-951.
- Berman, J.D.; P. Rainey y D.V. Santi. 1983. Metabolism of formycin B by *Leishmania amastigotes in vitro*. Comparative metabolism in infected and uninfected human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 158:252-257.
- Brown, H.W. y F.A. Neva. 1983. *Basic Clinical Parasitology*. Fifth edition. Appleton Century Crofts, Connecticut. 348 pp.
- Chaudhuri G.; T.K. Chatterjee y A.B. Banerjee. 1982. Growth factor requirements for in vitro growth of *Leishmania donovani*. *Indian Journal of Medicine Research* 76:157-163.
- Chaves, F.; S. Silva y R. Zeledón. 1982. Comparison of two culture media for the isolation of *Leishmania* strains. *The Journal of Parasitology* 68(2):346-347.
- Coombs, G.H. y J. Baxter. 1984. Inhibition of *Leishmania amastigote* growth by antipain and leupeptin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 78(1):21-24.
- Cuba Cuba, C.A.; E.M. Netto; P.D. Marsden; A. de C. Rosa Llanos Cuentas y J.L.M. Costa. 1986. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80:456-457.
- Goodman, L.S. y A. Gilman. 1980. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 5ta edición. Nueva Editorial Interamericana, México 1472 pp.
- Grimaldi Jr., G.; C.L. Jaffe; D. McMahon-Pratt y A. Falqueto. 1984. A simple procedure for the isolation of leishmanial parasites and for the recovery of parasite virulence in avirulent stocks. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78:560.

- Hill, J.O.; R.J. North y F.M. Collins. 1983. Advantages of mesuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 39(3):1087-1094.
- Kern, P. 1981. Leishmaniasis. *Antibiotics Chemotherapy* 30:203-223.
- Lainson, R. y J.J. Shaw. 1970. Leishmaniasis in Brasil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Gross State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64(5):654-667.
- Marín, F.; J. García de Lomas; M.P.G. Peñarrubia y J. Peñalver. 1982. Cultivation of *Leishmania*: Comparison of different media for promastigote cultivation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76(6):607-613.
- Marinkelle, C.J. 1981. The practical importance of culturing *Leishmania* isolated from patients with cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75(4):609-610.
- Mayorga, M.M. Cultivo de *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis*: Comparación de diferentes medios de cultivo para promastigotes. Tesis en preparación previo a obtener el título de Licenciada en Biología.
- Mérida, A.M. de; B. Arana; F. Arana; E. Silva y T. Navin. 1987. Diagnóstico de leishmaniasis cutánea en Guatemala usando o con el uso de probes de DNA del kinetoplasto. *Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Parasitología y I Congreso Guatemalteco de Parasitología y Medicina Tropical* 280 pp.
- Navin, T.R. y R.D. Pearson. 1987. Inhibition of *Leishmania donovani* growth by streptomycin and tobramycin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 81(6):731-733.

- Navin, T.R.; F. Steurer; A.M. de Mérida; F.E. Arana y M.F. Torres. 1988. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Isoenzyme characterizations of isolates from humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38(1):50-51.
- Organización Panamericana de la Salud. 1987. Parásitos de la sangre comunes en el hombre. Ciclos de vida. Washington, D.C. 44 pp.
- Palomino, J.C.; H. Guerra y H. Lumbreras. 1983. A selective liquid medium for primary isolation of South American leishmanias. *Tropical and Medical Parasitology* 34:229-232.
- Pearson, R.D. 1984. Leishmaniasis: The pathologic spectrum. *Hospital Practice*. Appendix 100E-100X.
- Sacks, D.L. y P.V. Perkins. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223:1417-1419.
- Samayoa, T. Comparación del crecimiento de *Leishmania* según el método de obtención de la muestra y el tipo de sangre utilizado en los medios de cultivo. Tesis en preparación previo a obtener el título de Licenciada en Biología.
- Walton, B.C.; J.J. Shaw y R. Lainson. 1977. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Parasitology* 63(6): 1118-1119.

VII ANEXOS

APENDICE I

Ciclo vital de *Leishmania*.

Las leishmanias aparecen en dos formas morfológicas distintas: el promastigote flagelado, en el insecto vector y el amastigote no flagelado, en el hospedero mamífero. El amastigote es un parásito intracelular obligado de los macrófagos. El parásito se multiplica rápidamente por fisión binaria llevando finalmente a la ruptura del macrófago. Los parásitos se liberan e infectan otros macrófagos o son ingeridos por las hembras flebotominas durante su alimentación por sangre. En el caso que las leishmanias se transformen a promastigotes, el intestino de la mosca atraviesa una serie de cambios morfológicos y de nuevo se multiplica rápidamente. Los parásitos flagelados migran hacia la proboscis del insecto y eventualmente son inoculados en la piel de otro hospedero vertebrado cuando la mosca se alimenta de nuevo. Los promastigotes son rápidamente limpiados por fagocitos mononucleares y pierden el flagelo asemejando una forma de amastigote, en donde el ciclo de vida del parásito se completa, habiendo pasado por un hospedero vertebrado y un hospedero insecto (Kern 1981).

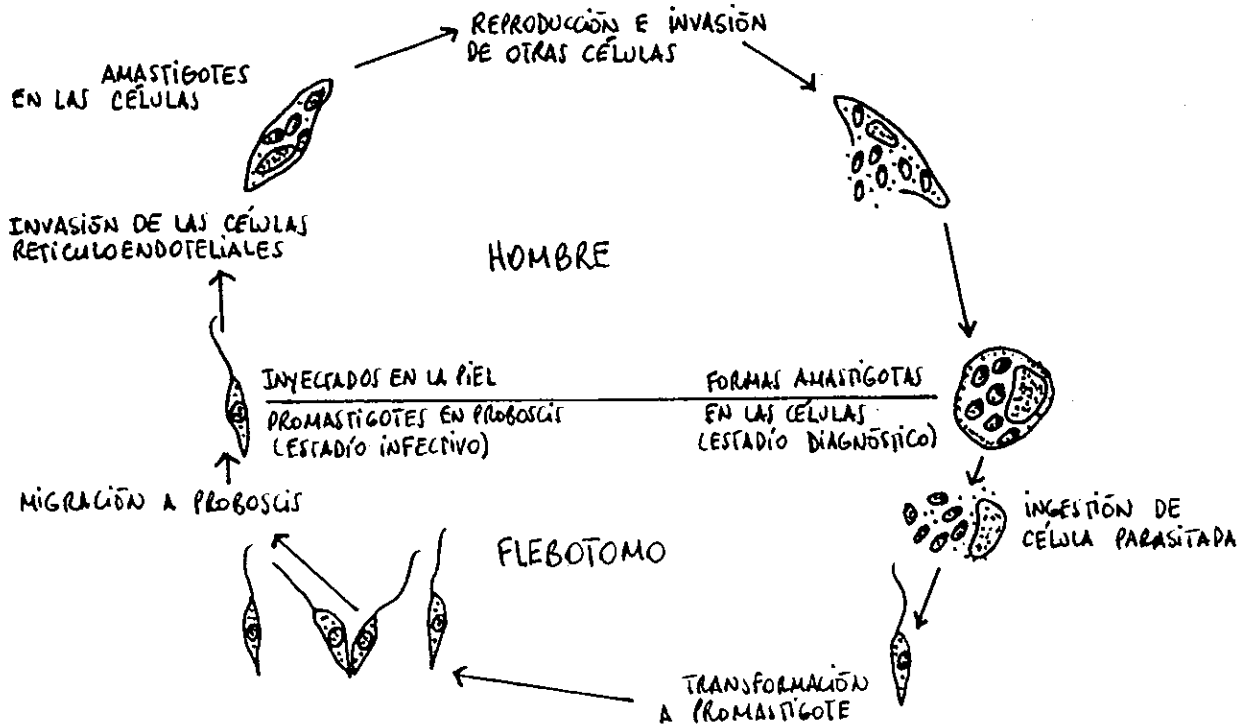


FIGURA 7. Ciclo biológico de *Leishmania* (Organización Panamericana de la Salud 1987).

APENDICE II

Componentes del medio líquido de Schneider de *Drosophila*.

SALES INORGANICAS	mg/ml
CaCl ₂ (anhídrido)	600.0
KCl	1600.0
KH ₂ PO ₄	450.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	3700.0
NaHCO ₃	2100.0
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1321.0
OTROS COMPONENTES	
ácido alfa-ketoglutarico	200.0
ácido fumárico	100.0
D-glucosa	2000.0
ácido málico	100.0
ácido succínico	100.0
trehalosa	2000.0
yeastolate	2000.0
AMINOACIDOS	
beta-alanina	500.0
L-arginina	400.0
L-ácido aspártico	400.0
L-cisteína	60.0
L-cistina	100.0
L-ácido glutámico	800.0
L-glutamina	1800.0
glicina	250.0
L-histidina	400.0
L-isoleucina	150.0
L-leucina	150.0
L-lisina HCl	1650.0
L-metionina	800.0
L-fenilalanina	150.0
L-prolina	1700.0
L-serina	250.0
L-treonina	350.0
L-triptófano	100.0
L-tirosina	500.0
L-valina	300.0

Información sacada de: Productos de Cultivo de Tejidos,
Laboratorios GIBCO.

APENDICE III

CUADRO # III-1

Promedios de crecimiento de *L. braziliensis* ssp. (subespecie #1) y *L. braziliensis braziliensis* (subespecie #2) durante 23 días *.

DIA	ESPECIE (promastigotes/ml)	
	<i>L. b. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> ssp.
1	2.6×10^5	2.6×10^4
2	7.0×10^5	3.8×10^4
3	1.2×10^6	2.8×10^4
4	1.9×10^6	3.0×10^5
5	3.9×10^6	7.5×10^5
6	5.6×10^6	1.4×10^6
7	1.2×10^7	2.9×10^6
8	1.9×10^7	2.7×10^6
9	2.3×10^7	4.6×10^6
10	2.6×10^7	5.7×10^6
11	2.4×10^7	5.3×10^6
12	4.1×10^7	3.2×10^6
13	2.9×10^7	4.3×10^6
14	3.0×10^7	3.2×10^6
15	4.1×10^7	3.3×10^6
16	3.7×10^7	2.3×10^6
17	3.4×10^7	4.6×10^6
18	1.5×10^7	4.8×10^6
19	2.2×10^7	-----
20	1.9×10^7	8.1×10^6
21	2.6×10^7	1.5×10^7

* Se expresa a partir del tercer día de inoculación que corresponde al primer día de conteo.

CUADRO # III-2

Medianas de conteos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en cuatro concentraciones de Penicilina.

DIA *	CONCENTRACION (ug/ml)			
	0	50	100	200
1	1.2×10^5	5.7×10^5	9.4×10^5	$< 1 \times 10^4$
2	2.2×10^5	6.0×10^5	8.7×10^5	8.0×10^4
3	1.1×10^6	9.2×10^5	8.7×10^5	1.7×10^5
4	3.0×10^6	9.8×10^5	7.7×10^5	8.5×10^5
5	3.0×10^6	2.1×10^6	4.3×10^6	2.6×10^6
6	3.4×10^7	2.8×10^6	2.6×10^6	3.6×10^6
7	1.5×10^7	8.4×10^6	1.0×10^7	1.1×10^7
8	1.3×10^7	2.3×10^7	2.0×10^7	7.3×10^6
9	1.5×10^7	1.8×10^7	8.9×10^6	1.7×10^7
10	1.5×10^7	1.4×10^7	2.3×10^7	1.7×10^7
11	1.9×10^7	2.7×10^7	2.3×10^7	2.1×10^7
12	2.4×10^7	1.9×10^7	1.3×10^7	2.8×10^7
13	3.1×10^7	1.2×10^7	1.1×10^7	4.0×10^7
14	6.5×10^7	1.9×10^7	1.9×10^7	1.1×10^7
15	1.3×10^7	1.5×10^7	2.1×10^7	1.6×10^7
16	1.4×10^7	2.5×10^7	3.2×10^7	3.6×10^7
17	-----	-----	-----	-----
18	-----	-----	-----	-----
19	6.2×10^6	1.6×10^7	1.2×10^7	4.8×10^7
20	6.0×10^6	1.1×10^7	1.3×10^7	2.1×10^7
21	1.7×10^7	3.0×10^7	3.7×10^7	3.4×10^7

* El día 1 corresponde al tercer día de la inoculación.

CUADRO # III-3

Medianas de conteos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en cuatro concentraciones de Gentamicina.

DIA *	CONCENTRACION (ug/ml)			
	0	50	100	200
1	7.0×10^4	1.9×10^5	1.0×10^4	2.0×10^4
2	$< 1 \times 10^4$	3.7×10^5	9.0×10^4	3.0×10^4
3	1.0×10^4	8.7×10^5	1.5×10^5	8.0×10^4
4	3.0×10^4	8.8×10^5	4.5×10^5	2.0×10^5
5	-----	9.5×10^5	1.9×10^6	7.7×10^5
6	1.5×10^5	3.9×10^6	1.4×10^6	3.1×10^6
7	1.0×10^6	4.3×10^6	2.1×10^6	3.9×10^6
8	8.8×10^5	9.8×10^6	1.3×10^7	3.9×10^6
9	2.3×10^6	9.3×10^6	9.4×10^6	5.9×10^6
10	3.4×10^6	5.1×10^6	1.1×10^7	8.3×10^6
11	9.4×10^6	1.3×10^7	6.6×10^6	8.4×10^6
12	5.4×10^7	2.0×10^7	2.1×10^7	3.0×10^7
13	1.7×10^7	9.6×10^6	5.2×10^6	5.3×10^7
14	1.3×10^7	1.7×10^7	1.6×10^7	1.6×10^7
15	4.1×10^7	2.3×10^7	1.1×10^7	3.4×10^7
16	4.6×10^7	9.2×10^6	8.3×10^6	3.0×10^7
17	-----	-----	-----	-----
18	-----	-----	-----	-----
19	7.7×10^6	6.9×10^6	9.1×10^6	4.5×10^7
20	1.1×10^7	5.3×10^6	2.5×10^6	1.2×10^7
21	3.0×10^7	8.1×10^6	3.9×10^6	3.6×10^7

* El día 1 corresponde al tercer día de la inoculación.

CUADRO # III-4

Medianas de conteos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en cuatro concentraciones de estreptomycinina.

DIA *	CONCENTRACION (ug/ml)			
	0	50	100	200
1	1.0×10^4	1.0×10^4	1.8×10^5	1.4×10^5
2	-----	9.0×10^4	6.1×10^5	3.1×10^5
3	2.0×10^4	-----	5.6×10^5	8.8×10^5
4	1.1×10^5	3.5×10^5	2.4×10^6	1.9×10^6
5	2.4×10^5	1.1×10^5	1.4×10^6	3.3×10^6
6	5.8×10^5	7.5×10^5	6.0×10^6	5.1×10^6
7	1.1×10^6	1.1×10^6	1.9×10^7	2.0×10^7
8	1.6×10^6	6.5×10^5	1.5×10^7	1.3×10^7
9	2.9×10^6	1.7×10^6	1.9×10^7	2.9×10^7
10	2.5×10^6	1.8×10^6	1.6×10^7	1.7×10^7
11	3.5×10^6	2.4×10^6	2.1×10^7	1.1×10^7
12	6.0×10^6	5.3×10^6	3.3×10^7	2.3×10^7
13	4.1×10^6	1.0×10^7	1.3×10^7	1.3×10^7
14	4.9×10^6	2.3×10^6	2.0×10^7	2.3×10^7
15	4.8×10^6	1.2×10^7	9.1×10^6	1.1×10^7
16	3.1×10^6	2.1×10^7	8.4×10^6	1.3×10^7
17	3.1×10^6	1.2×10^7	-----	-----
18	4.7×10^6	8.2×10^6	-----	-----
19	-----	1.3×10^7	5.2×10^6	5.7×10^6
20	8.1×10^6	4.2×10^6	4.4×10^6	7.3×10^6
21	1.5×10^7	1.0×10^7	8.9×10^6	2.2×10^7

* El día 1 corresponde al tercer día de la inoculación.

CUADRO # III-5

Medianas de conteos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en cuatro concentraciones de amikacina.

DIA *	CONCENTRACION (ug/ml)			
	0	50	100	200
1	< 1 X 10 ⁴	< 1 X 10 ⁴	< 1 X 10 ⁴	3.0 X 10 ⁴
2	< 1 X 10 ⁴	< 1 X 10 ⁴	4.0 X 10 ⁴	4.0 X 10 ⁴
3	< 1 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	2.5 X 10 ⁵	1.2 X 10 ⁵
4	2.0 X 10 ⁴	2.0 X 10 ⁴	4.7 X 10 ⁵	2.8 X 10 ⁵
5	-----	3.0 X 10 ⁴	1.3 X 10 ⁵	2.0 X 10 ⁵
6	4.4 X 10 ⁵	3.5 X 10 ⁴	4.7 X 10 ⁵	2.6 X 10 ⁵
7	7.1 X 10 ⁵	2.1 X 10 ⁵	9.3 X 10 ⁵	6.1 X 10 ⁵
8	9.3 X 10 ⁵	3.8 X 10 ⁵	1.7 X 10 ⁶	4.8 X 10 ⁵
9	1.7 X 10 ⁶	1.2 X 10 ⁶	2.7 X 10 ⁶	1.5 X 10 ⁷
10	3.0 X 10 ⁶	1.9 X 10 ⁶	1.5 X 10 ⁶	1.1 X 10 ⁷
11	9.0 X 10 ⁵	1.6 X 10 ⁶	4.9 X 10 ⁶	5.2 X 10 ⁶
12	2.0 X 10 ⁶	2.9 X 10 ⁵	3.0 X 10 ⁷	3.7 X 10 ⁶
13	3.7 X 10 ⁶	6.2 X 10 ⁵	2.0 X 10 ⁷	5.6 X 10 ⁶
14	5.1 X 10 ⁶	3.5 X 10 ⁶	2.3 X 10 ⁶	3.3 X 10 ⁶
15	5.3 X 10 ⁶	6.0 X 10 ⁵	2.2 X 10 ⁷	6.7 X 10 ⁶
16	6.0 X 10 ⁶	8.2 X 10 ⁵	7.9 X 10 ⁶	3.6 X 10 ⁶
17	8.2 X 10 ⁶	-----	6.9 X 10 ⁶	-----
18	1.1 X 10 ⁷	-----	8.0 X 10 ⁶	-----
19	-----	-----	1.6 X 10 ⁷	-----
20	2.0 X 10 ⁷	6.3 X 10 ⁶	6.3 X 10 ⁶	5.9 X 10 ⁶
21	1.8 X 10 ⁷	1.7 X 10 ⁷	1.1 X 10 ⁷	6.2 X 10 ⁶

* El día 1 corresponde al tercer día de la inoculación.

CUADRO # III-6

Medianas de conteos de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en cuatro cocentraciones de 5-fluorocitosina.

DIA *	CONCENTRACION (ug/ml)			
	0	50	100	200
1	< 1 X 10 ⁴	6.0 X 10 ⁴	3.0 X 10 ⁴	< 1 X 10 ⁴
2	< 1 X 10 ⁴	2.4 X 10 ⁵	5.3 X 10 ⁵	1.0 X 10 ⁴
3	5.0 X 10 ⁴	4.2 X 10 ⁵	4.9 X 10 ⁵	8.0 X 10 ⁴
4	3.4 X 10 ⁵	3.6 X 10 ⁵	7.5 X 10 ⁵	3.1 X 10 ⁵
5	1.6 X 10 ⁵	1.3 X 10 ⁶	1.4 X 10 ⁶	7.5 X 10 ⁵
6	6.2 X 10 ⁵	1.9 X 10 ⁶	2.4 X 10 ⁶	1.9 X 10 ⁶
7	2.3 X 10 ⁶	2.0 X 10 ⁶	2.4 X 10 ⁶	7.2 X 10 ⁶
8	2.4 X 10 ⁶	3.5 X 10 ⁶	2.0 X 10 ⁶	4.0 X 10 ⁶
9	4.6 X 10 ⁶	5.9 X 10 ⁶	4.2 X 10 ⁶	8.6 X 10 ⁶
10	5.6 X 10 ⁶	7.3 X 10 ⁶	1.1 X 10 ⁷	8.7 X 10 ⁶
11	3.9 X 10 ⁶	7.1 X 10 ⁶	4.7 X 10 ⁶	5.5 X 10 ⁶
12	2.1 X 10 ⁶	2.3 X 10 ⁷	5.1 X 10 ⁶	1.5 X 10 ⁶
13	1.7 X 10 ⁷	1.6 X 10 ⁷	4.9 X 10 ⁶	5.9 X 10 ⁶
14	9.9 X 10 ⁶	-----	-----	1.9 X 10 ⁶
15	6.1 X 10 ⁶	9.9 X 10 ⁶	3.4 X 10 ⁷	4.1 X 10 ⁶
16	4.7 X 10 ⁶	1.0 X 10 ⁷	8.3 X 10 ⁶	2.7 X 10 ⁶
17	-----	1.4 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷	-----
18	-----	1.1 X 10 ⁷	1.3 X 10 ⁷	-----
19	3.2 X 10 ⁶	-----	2.3 X 10 ⁷	-----
20	3.5 X 10 ⁶	4.0 X 10 ⁶	1.6 X 10 ⁷	7.5 X 10 ⁶
21	1.1 X 10 ⁷	3.8 X 10 ⁶	1.9 X 10 ⁷	7.1 X 10 ⁶

* El día 1 corresponde al tercer día de inoculación.

CUADRO # III-7

Valores de las variables utilizadas en el análisis de varianza (ANDEVA) Trifactorial para el caso de *L. braziliensis* ssp. o subespecie #1.

ANTIBIOTICO (ug/ml)	REPLICA	----- VARIABLES -----				
		PICO (promastigotes/ml)	D MAX (días)	DIA 6 (días)	DIA 16 (días)	
PENICILINA	0	A	1.7 x 10 ⁷	23	04	20
		B	4.4 x 10 ⁷	23	10	12
	50	A	3.3 x 10 ⁷	23	14	10
		B	1.8 x 10 ⁷	23	14	10
	100	A	4.2 x 10 ⁷	23	14	10
		B	4.6 x 10 ⁷	23	12	10
	200	A	2.4 x 10 ⁷	13	17	06
		B	1.6 x 10 ⁷	13	16	07
GENTAMICINA	0	A *	-----	--	--	--
		B	3.5 x 10 ⁷	23	13	09
	50	A	9.4 x 10 ⁶	23	09	12
		B	6.8 x 10 ⁶	23	09	12
	100	A	1.6 x 10 ⁵	11	00	-- **
		B	8.6 x 10 ⁵	17	00	-- **
	200	A	1.2 x 10 ⁷	13	17	07
		B	7.9 x 10 ⁶	12	06	08
ESTREPTO- MICINA	0	A	1.9 x 10 ⁷	23	15	09
		B	1.3 x 10 ⁷	23	13	11
	50	A	1.2 x 10 ⁷	23	09	13
		B	8.4 x 10 ⁶	23	13	11
	100	A	1.4 x 10 ⁷	23	10	11
		B	3.2 x 10 ⁷	23	08	11
	200	A	1.3 x 10 ⁶	12	03	09
		B	4.1 x 10 ⁷	23	18	06
AMIKACINA	0	A *	-----	--	--	--
		B	2.0 x 10 ⁷	22	15	09
	50	A	2.6 x 10 ⁷	23	05	19
		B	8.0 x 10 ⁶	23	09	11
	100	A	1.3 x 10 ⁶	13	04	09
		B	1.7 x 10 ⁷	23	14	10
	200	A	1.5 x 10 ⁷	12	12	07
		B	4.1 x 10 ⁷	22	15	07

5-FLUORO-	0	A	8.7×10^6	17	16	08
CITOSINA		B	3.0×10^7	16	18	06
	50	A	7.3×10^6	12	13	07
		B	8.2×10^6	13	15	07
	100	A	1.5×10^7	23	16	08
		B	1.0×10^7	13	17	07
	200	A	2.4×10^7	23	16	08
		B	8.7×10^6	10	12	07

VARIABLES:

PICO = Concentración máxima alcanzada. Está dada en número de promastigotes por mililitro.

D MAX = Día en que se obtuvo el pico. Está expresada en número de días a partir del día de inoculación.

DIA 6 = Período en que se tiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 . Está expresada en número de días.

DIA 16 = Día en que se tiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 por primera vez. Está expresada en número de días a partir del día de inoculación.

* TUBO DESCARTADO

** EN LOS 23 DIAS DE OBSERVACION Y CONTEO, NO SE OBTUVO UNA CONCENTRACION MAYOR O IGUAL A 1×10^6 .

CUADRO # III-8

Valores de las variables utilizadas en el análisis de varianza (ANDEVA) Trifactorial para el caso de *L. b. braziliensis* ssp. o subespecie #2.

ANTIBIOTICO (ug/ml)	REPLICA	----- VARIABLES -----				
		PICO (promastigotes/ml)	D MAX (días)	DIA 6 (días)	DIA 16 (días)	
PENICILINA 0	A	6.2 x 10 ⁷	13	17	05	
	B	9.8 x 10 ⁷	15	20	04	
	C	7.8 x 10 ⁷	12	19	05	
	D	1.5 x 10 ⁸	17	18	05	
	50	A	8.8 x 10 ⁷	18	20	04
		B	8.0 x 10 ⁷	10	20	04
		C	6.4 x 10 ⁷	12	19	05
		D	6.2 x 10 ⁷	12	19	05
	100	A	5.8 X 10 ⁷	18	19	05
		B	8.1 x 10 ⁷	14	20	04
		C	9.5 x 10 ⁷	07	19	05
		D	5.9 x 10 ⁷	07	19	05
	200	A	9.5 x 10 ⁷	12	16	08
		B	8.9 x 10 ⁷	18	18	06
		C	4.0 x 10 ⁷	07	19	05
		D	8.2 x 10 ⁷	12	19	05
GENTAMICINA 0	A	1.2 x 10 ⁸	12	20	04	
	B	6.2 x 10 ⁷	17	13	11	
	C	6.8 x 10 ⁷	12	19	05	
	D	9.1 x 10 ⁷	17	19	05	
	50	A	4.4 x 10 ⁷	17	19	05
		B	5.9 x 10 ⁷	14	20	04
		C	7.8 x 10 ⁷	07	19	05
		D	4.4 x 10 ⁷	12	19	05
	100	A	4.4 X 10 ⁷	17	17	07
		B	5.1 x 10 ⁷	14	19	05
		C	4.0 x 10 ⁷	07	19	05
		D	6.5 x 10 ⁷	07	19	05
	200	A	7.6 x 10 ⁷	18	14	10
		B	9.1 x 10 ⁷	13	17	07
		C	1.1 x 10 ⁸	12	19	05
		D	7.5 x 10 ⁷	07	19	05
ESTREPTO- MICINA 0	A	4.0 x 10 ⁴	12	00	-- **	
	B	7.7 x 10 ⁷	15	16	08	
	C	4.9 x 10 ⁷	07	19	05	
	D	6.9 x 10 ⁷	12	19	05	

ESTREPTO- MICINA	50	A	5.5×10^7	14	15	08
		B	5.7×10^7	19	16	08
		C	7.8×10^7	07	19	05
		D	1.7×10^8	12	19	05
	100	A	1.3×10^8	13	20	04
		B	6.5×10^7	14	20	04
		C	8.0×10^7	12	19	05
		D *	-----	--	--	--
	200	A	4.7×10^7	11	19	05
		B	6.9×10^7	12	19	05
		C	5.8×10^7	17	19	05
		D *	-----	--	--	--
AMIKACINA	0	A *	-----	--	--	--
		B	9.0×10^7	19	11	14
		C	8.1×10^7	12	19	05
		D	6.7×10^7	12	19	05
	50	A	1.0×10^8	08	00	-- **
		B	1.2×10^8	21	11	11
		C	7.0×10^7	07	19	05
		D	5.9×10^7	17	19	05
	100	A	7.0×10^7	17	15	08
		B	5.5×10^7	14	15	06
		C	8.5×10^7	07	19	05
		D	6.0×10^7	12	19	05
	200	A	3.0×10^7	15	17	07
		B	1.0×10^8	09	00	-- **
		C	4.1×10^7	12	19	05
		D	9.9×10^7	17	19	05
5-FLUORO- CITOSINA	0	A	4.0×10^8	14	00	-- **
		B	5.7×10^7	16	13	11
		C	8.7×10^7	07	19	05
		D	9.0×10^7	07	18	05
	50	A	5.1×10^7	15	16	08
		B	4.6×10^7	21	16	08
		C	5.8×10^7	07	19	05
		D	6.7×10^7	07	19	05
	100	A	6.4×10^7	17	19	05
		B	8.4×10^7	17	19	06
		C	7.4×10^7	07	19	05
		D	4.2×10^7	12	19	05
	200	A	4.7×10^7	14	19	05
		B	2.0×10^8	08	00	-- **
		C	1.3×10^8	12	19	05
		D	1.2×10^8	12	19	05

VARIABLES:

PICO = Concentración máxima alcanzada. Está dada en número de promastigotes por mililitro.

D MAX = Día en que se obtuvo el pico. Está expresada en número de días a partir del día de inoculación.

DIA 6 = Período en que se tiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 . Está expresada en número de días.

DIA 16 = Día en que se tiene una concentración de promastigotes mayor o igual a 1×10^6 por primera vez. Está expresada en número de días a partir del día de inoculación.

* TUBO DESCARTADO

** EN LOS 23 DIAS DE OBSERVACION Y CONTEO, NO SE OBTUVO UNA CONCENTRACION MAYOR O IGUAL A 1×10^6 .