

# Medio semidefinido para el cultivo de promastigotas de *Leishmania infantum*

Semi-defined medium for cultivating *Leishmania infantum* promastigotes.

LOZANO, J., CAMPOS, M., MAÑAS, I., y DIAZ, V.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071 Granada. España.

## RESUMEN

Se describe un medio libre de suero y químicamente semidefinido para el crecimiento de promastigotas de *Leishmania infantum*. Se utilizó medio PM-SFCM, que también se modificó añadiéndole hemina y/o suplemento nutritivo. Los mejores resultados se obtuvieron usando PM-SFCM con hemina y suplemento nutritivo.

**Palabras clave:** *Leishmania infantum*. Medios semidefinidos. Promastigotas.

## ABSTRACT

A chemically semi-defined serum free medium, to grow the promastigotes of *Leishmania infantum* is described. The medium PM-SFCM was used and modified by the addition of hemin and/or nutritional supplement. The best results were obtained by using PM-SFCM with both hemin and nutritional supplement.

**Key words:** *Leishmania infantum*. Semi-defined media. Promastigotes.

Recibido: 12-6-1996.

Aceptado: 4-9-1996.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:3; 563-567]

## INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo, definidos químicamente, se han venido utilizando para el cultivo de especies de hemoflagelados (1, 2, 3, 4, 5, 6). Estos medios están compuestos, normalmente, de nutrientes conocidos: aminoácidos, vitaminas, azúcares, nucleótidos, nucleósidos o sus bases y trazas de otros elementos en una solución buffer.

En este estudio, se ha ensayado un medio líquido semidefinido, sin suero, para el cultivo de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, comparando su crecimiento con el obtenido en el medio de cultivo RPMI-1640 + 20% de

miento al tercer día post-inóculo, decreciendo progresivamente y ya el séptimo día se encontraron a concentraciones inferiores a la del inóculo.

Cuando el medio se adicionó con hemina o con suplemento, los cultivos experimentaron un ligero crecimiento los días tercero y cuarto, manteniéndose prácticamente a la misma concentración hasta el séptimo día.

Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar medio PM-SFCM con hemina y con suplemento nutritivo.

En las Figuras 1 y 2 se compara la cinética de crecimiento de las células cultivadas en medio RPMI-1640 + 20% SBF, que se empleó como referencia, con la obtenida en las diferentes variantes del medio PM-SFCM.

## DISCUSION

Una gran variedad de medios de cultivo complejos han sido utilizados para el crecimiento "in vitro" de formas promastigotas de varias especies de *Leishmania* (7, 8). En los últimos años se han descrito varios medios definidos, adecuados para el crecimiento exponencial de promastigotas de *Leishmania* spp., algunos de ellos con fórmulas complejas (3, 5, 9) y otros más sencillos (10, 11, 6), que se pueden obtener comercialmente.

En este trabajo hemos ensayado por primera vez para el cultivo de *L. infantum*, el medio definido PM-SFCM, que se probó solo y tras la adición de suplemento nutritivo (2%), hemina (5 mg/ml) o ambos.

Para la inclusión de hemina en el medio, nos basamos en los hallazgos de varios autores que apuntan que la hemina es esencial para el crecimiento de los hemoflagelados (3, 11, 5, 12, 6); mientras que aquellos que contienen simbioses capaces de sintetizarla "de novo" no la requieren (13). En el caso de medio con suplemento y hemina se obtuvieron resultados comparables a los del medio que utilizamos como referencia (RPMI-1640 + 20% SBF), tanto en la concentración de promastigotas como en lo referente a la típica morfología de estas formas.

En este caso, los cultivos se pueden mantener, en fase logarítmica de crecimiento, realizando pases sucesivos cada 6 días. Estos resultados demuestran la posibilidad de cultivar promastigotes de *L. infantum* en este medio de cultivo. Además, el empleo de medios libres de macromoléculas permiten el estudio de los productos liberados por los parásitos durante su crecimiento "in vitro", y la obtención de masa de promastigotas sin proteínas extrañas absorbidas en su superficie.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por D.G.I.C.Y.T., Proyecto 90-0141. Agradecemos a Biostar S.A. el suministro del medio RPMI-1640 y el suplemento nutritivo.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Cross, G. and Manning, J. Cultivation of *Trypanosoma brucei* ssp. in semi-defined and defined media. *Parasitology* (1973) **67**:315-331.
- (2) Steiger, R. F. and Steiger, E. A defined medium for cultivating *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. *J. Parasitol.* (1976) **62**:1010-1011.
- (3) Steiger, R. F. and Steiger, E. Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media. Nutritional requirements. *J. Protozool.* (1977) **24**:437-441.
- (4) Azevedo, H. P. and Roitman, I. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in defined medium. In: *Genes and antigens of parasites.* (Edited by Morel C.) (1984) pp. 29-36. The Proceedings of a Course Sponsored by UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Brasil.
- (5) Melo, N. M., De Azevedo, H. P., Roitman, I. and Mayrink W. A new defined medium for cultivating *Leishmania* promastigotes. *Acta Trop.* (1985) **42**:137-141.
- (6) McCarthy-Burke, C., Bates, P. A. and Dwyer, D. M. *Leishmania donovani*: Use of two different, commercially available, chemically defined media for the continuous in vitro cultivation of promastigotes. *Exp. Parasitol.* (1991) **73**:385-387.
- (7) Jaffe, C. L., Grimaldi, G. and McMahon-Pratt, D. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: *Genes and antigens of parasites.* (Edited by Morel C.M.) (1984) pp. 47-91. The Proceedings of a Course Sponsored by UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Brasil.
- (8) Chang, K. P. and Hendricks, L. D. Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. In: *Leishmaniasis* (Edited by Chang and Bray) (1985) pp. 213-244. Elsevier. Amsterdam.
- (9) Chaudhuri, G., Ghoshal, K., Sen, S. and Banerjee, A. B. A new medium for large-scale production of *Leishmania donovani* promastigotes for biochemical studies. *Indian J. Med. Res.* (1986) **84**:457-460.
- (10) Berens, R. L. and Marr, J. J. An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigote. *J. Parasitol.* (1978) **64**:160.
- (11) Steiger, R. F. and Black, C. D. V. Simplified defined media for cultivating *Leishmania donovani* promastigotes. *Acta Trop.* (1980) **37**:195-198.
- (12) Kar, K., Mukerji, K., Naskar, K., Bhattacharya, A. and Ghosh, D. K. *Leishmania donovani*: A chemically defined medium suitable for cultivation and cloning of promastigotes and transformation of amastigotes to promastigotes. *J. Protozool.* (1990) **37**:277-279.
- (13) Chang, K. P. and Trager, W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. *Science* (1974) **183**:531-532.