

REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL – INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION

CARTA DE PRESENTACIÓN:

Además del título del documento y de adjuntar el nombre y direcciones de 3 posibles revisores (de diferentes instituciones) en su carta de presentación, le solicitamos incluir un párrafo en el que resuma cuál es la contribución principal de su investigación a la ciencia y a la biología tropical.

MUESTRA DE FORMATO

Por favor siga el formato de este ejemplo de documento en español cuando prepare su borrador. Los aspectos importantes aparecen en las cajas amarillas, pero ud. también puede revisar las normas en la guía de autores de nuestra página.

Morfología y citoquímica de cultivos celulares de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y susceptibilidad a *Leishmania panamensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

El título es en negrita, a excepción de los nombres científicos. Para estudios de plantas se coloca la **Familia** y para los de animales (**Orden: Familia**).

Los nombres de los autores se escriben completos, y los apellidos van al final del nombre en todos los casos. Las direcciones son numeradas, no marcadas con asteriscos. Incluya correo electrónico de todos los coautores. No incluya teléfonos ni faxes.

Alfonso Arturo Miranda H.¹, Ladys Sarmiento¹, Maria Leonor Caldas M.¹, Cristina Zapata² & Felio Jesús Bello G.³

¹Grupo de Microscopía y Análisis de Imágenes, Instituto Nacional de Salud, Av. Calle 26 N° 51-60 Bogotá, Colombia; lsarmiento@ins.gov.co

²Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética, Departamento de Ciencias Básicas Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia; angzapl@yahoo.com.mx

³Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia; fbello@urosario.edu.co

Las direcciones terminan con un “;” que es inmediatamente seguido por la dirección de correo electrónico de todos los autores separados por comas (**no** incluya la palabra “email”).


“Abstract” se escribe en minúsculas y negrita, seguido por el título en inglés, un párrafo introductorio, resumen de los métodos, resultados y las conclusiones principales; todo en un mismo párrafo de 300-500 palabras.

Abstract: Morphology and cytochemistry of *Aedes aegypti*'s cell culture (Diptera: Culicidae) and susceptibility to *Leishmania panamensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). The first cell line of *Aedes aegypti* was developed by Grace in 1966; later on, other cellular lines of this species were generated and since then they have been used for the study of pathogenic organisms like viruses, bacteria and parasites, showing their importance in biomedical applications. The present work describes, for the first time, some cytochemical characteristics of *A. aegypti*'s cell culture, infected with the (MHOM/CO/87CL412) strain of *Leishmania panamensis*. A morphological study of the culture's cells was also made. The maintenance of the cell culture, parasites and the infection in vitro were carried out in the Laboratory of Entomology, Cellular and Genetic Biology of the Universidad de La Salle. The cell cultures infected with the parasite were maintained in a medium Grace/L15 mixture, supplemented with a 10% fetal bovine serum (FBS) pH 6.8 and a temperature of 26°C, during three, six and nine post-infection days. Later on, these cell cultures were processed using High Resolution Light Microscopy (HRLM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) according to protocols standardized by the Group of Microscopy and Image Analyses of the Instituto Nacional de Salud. Semi-fine slices of 1µm colored with toluidine blue were used for the morphological analysis of the culture and ultra fine cuts of 60 to 90nm stained with uranyl acetate and lead citrate for the ultrastructural study. In addition, a PAS and peroxidase staining was carried out in cells fixed with methanol. The morphometric study was made with software ImageJ (NIH). In the semi-fine slices, small cells were observed with fibroblastic appearance with 10.84±2.54µm of length and 5.31±1.26µm of wide; other cells presented epithelial appearance with great peripheral nucleus, voluminous and vacuolated cytoplasm, with 23.04±4.00µm of 3.70 length and 13.96±3.70µm of wide. These last ones predominated over those of fibroblastic appearance. The 7.08% of the cells presented abundant PAS positive cytoplasmatic grains indicating presence of polysaccharides. The test of peroxidase gave a negative result. The greatest percentage of infection (18.90%) of a total of 101 cells, appeared day 6. Some cells analyzed by TEM presented a cytoplasm with a vacuolated aspect; some contained parasites, other fibrillar material and others were empty. The results indicate that the *A. aegypti*'s cell culture can support the internalization and transformation of the parasite, demonstrating the capability that these cell cultures have to be infected by *L. panamensis* and to maintain the infection for one week approximately.

Key words: periodic acid-Schiff, cell cultures, *Aedes aegypti*, *Leishmania panamensis*, transmission electron microscopy.

Incluya 5-7 **Key words** en minúscula y separadas por comas.

Se incluye el número total de palabras del documento al final de la primera página.

Número total de palabras: 25 361. 

Desde comienzos del siglo XX los entomólogos han tratado de mantener *in vitro* células de insecto como una herramienta en diferentes campos de estudio (Lynn 2002). Pero solo hasta 1962 Grace obtuvo la primera línea celular de insecto correspondiente a la polilla *Antheraea eucalypti*. Actualmente, existen más de 500 líneas celulares establecidas a partir de diversos tejidos de insectos, siendo mayor el número de éstas en dípteros y lepidópteros (Lynn 2001).

La primera línea celular de *Aedes aegypti* fue establecida por Grace en 1966; posteriormente, se generaron otras líneas celulares de esta misma especie (Bhat & Singh 1969, Varma & Pudney 1969). Desde entonces, diferentes cultivos celulares de mosquitos se han utilizado como sustratos para el aislamiento e identificación de arbovirus. Sin embargo, existe en la actualidad una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas (Singh 1972, Sudeep *et al.* 2005), así como también biomédicas, principalmente en investigaciones con algunas bacterias y parásitos (Syafuddin *et al.* 1992, Dobson *et al.* 2002). En esta última línea de acción, es importante resaltar el estudio realizado por Fampa *et al.* (2003), en el cual se muestra la interacción de ciertas especies de tripanosomátidos monoxenos con líneas celulares de *A. albopictus*, *Anopheles gambiae* y *Lutzomyia longipalpis*. De igual manera, se han realizado infecciones con *Trypanosoma brucei* en cultivos celulares del mosquito *A. gambiae*, en donde al parecer, no se disminuye la infectividad del parásito al utilizar estas células como sustrato (Kaminsky *et al.* 1987).

Las citas se colocan entre paréntesis, estrictamente en orden cronológico y separadas sólo por comas. No se usa coma entre los nombres y los años. En el texto las citas de dos autores se escriben con “&” y para más de dos autores se usa “*et al.*”. Para citas del mismo autor y mismo año de publicación se usan identificadores alfabéticos junto al año.

Con lo descrito en los anteriores antecedentes, se pretende resaltar la importancia que tienen los cultivos celulares de mosquitos, en el mantenimiento y estudio del ciclo biológico de tripanosomátidos, importantes en salud pública. Existen algunos trabajos en donde se reporta la infección de *Leishmania* en diferentes líneas celulares de macrófagos y células dendríticas (Berens & Marr 1979, Zuluaga & Robledo 2004, Sarmiento *et al.* 2006a, Sarmiento *et al.* 2006b), pero son pocas las investigaciones relacionadas con la interacción y maduración del parásito en cultivos celulares de insectos. Recientemente, se ha podido demostrar que los cultivos celulares de *L. longipalpis* y *L. spinicrassa* son susceptibles a la infección con *L. chagasi* y *L. braziliensis* respectivamente (Miranda *et al.* 2005, Bello *et al.* 2005, Zapata *et al.* 2005).

...

En el presente trabajo se describe, por primera vez, algunas características citoquímicas de los cultivos celulares de *A. aegypti*, infectados con *L. panamensis*; también se realizó un estudio morfológico de las células en cultivos y se reporta el porcentaje de infección de *L. panamensis* en estos sustratos celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Si su trabajo incluye coordenadas geográficas se escriben exactamente de la siguiente forma abreviada: 10°44'13" - 11°00'37" N and 85°34'48" - 85°58'51" W; note que "oeste" se abrevia con W, no con O, por normativa internacional; además, las comillas son rectas.

Los subtítulos de las secciones se escriben en negrita con dos puntos, seguidos por un espacio y el texto se inicia en mayúsculas.

Cultivos celulares e infección: El mantenimiento de los cultivos celulares, parásitos y la infección *in vitro*, fueron realizados en el Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Salle. Los cultivos celulares de *A. aegypti* fueron sembrados en seis placas de petri de 35x10mm e infectados con la cepa (MHOM/CO/87CL412) de *L. panamensis*, suministrada por el laboratorio de parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS). Los cultivos celulares, infectados con el parásito, fueron mantenidos en una mezcla de medios Grace/L15 suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, a un pH 6.8 y una temperatura de 26°C. En los días tres, seis y nueve post-infección se retiraron dos placas de petri, se lavaron con solución salina y se les realizó el proceso de fijación. De igual forma, se mantuvieron cultivos celulares del mosquito sin infectar.

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica: Se recibieron cultivos celulares con y sin infección. Las muestras fueron procesadas según protocolos estandarizados en el Grupo de Microscopía y Análisis de Imágenes del Instituto Nacional de Salud de la siguiente forma: se fijaron con Glutaraldehído al 3% en buffer fosfato 0.1M pH 7.2, luego, fueron lavadas tres veces con buffer fosfato 0.1M pH 7.2. Posteriormente, a los cultivos se le realizó una post-fijación con Tetróxido de Osmio (OsO₄) al 1% y fueron lavados con el mismo buffer fosfato mencionado anteriormente. Se realizó el proceso de deshidratación con etanol al 50, 70, 80, 95% y finalmente dos cambios de etanol al 100%. La infiltración fue realizada con cambios en mezclas de alcohol y resina epóxica Epón-Araldita en proporciones de 2:1 durante una hora, 1:1 durante una hora y dos cambios de resina pura durante 24 horas. Para la inclusión de las muestras se utilizó la mezcla de resina Epón-Araldita y se polimerizó a 68°C por 48 horas.

Los datos de temperatura se presentan de esta forma: 25.7°C (sin espacio luego del número). Tampoco se da un espacio entre los números y las unidades: 1 500-2 000m.

Posterior al procesamiento de las muestras, se obtuvieron cortes semifinos de 1µm los cuales, fueron coloreados con azul de toluidina para su estudio morfológico. La observación de las muestras fueron realizadas en un microscopio de luz Zeiss Axiophot.

Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 60 a 90nm, coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para el estudio ultraestructural, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109.

Para cifras numéricas, del uno al diez escriba las palabras (excepto si llevan unidades).

Morfometría celular: La captura de imágenes de las células en los días tercero, sexto y noveno post-infección y de las células no infectadas, se realizó por medio de una cámara Sony Hyper HAD CCD-IRIS/RGB adaptada a un microscopio de luz Zeiss Axiophot. Las imágenes digitales de las células no infectadas se analizaron por medio del software de acceso libre ImageJ versión v1.38 (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) (Rasband 1997, 2006). Se realizó un estudio morfométrico en el cual se tuvieron en cuenta los parámetros de largo y ancho de las células derivadas de los cultivos de *A. aegypti*, sin infección.

Los datos fueron analizados en el software Statistix 1.0 para Windows. Se les aplicó la prueba de Anova de una vía y el test de Tukey. Los resultados de la morfología celular, porcentaje de células con gránulos PAS positivo y porcentaje de células con vacuolas PAS positivo, fueron analizados en Microsoft Excel 2002, en donde se obtuvo promedio, desviación estándar y error estándar.

RESULTADOS

Los títulos de sección van en mayúsculas pero sin negrita (MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, etc.). La introducción no lleva título.

Morfología: En los cultivos celulares correspondientes a células no infectadas, se observaron dos grupos de células morfológicamente diferentes: uno constituido por células de apariencia fibroblastoide de dimensión promedio (Media=10.84, DE=2.54, n=50) de largo, y (Media=5.31, DE=1.26 μ m) de ancho, cuyo citoplasma presentaba algunas vacuolas, como se observa en la Fig. 1. El otro grupo estuvo conformado por células de apariencia epitelioide, de unas dimensiones entre 23.04; 4.00 μ m de largo y 13.96; 3.70 μ m de ancho, con un núcleo prominente y citoplasma ocupado por numerosas vacuolas (Fig. 1). Estas últimas predominaron sobre las de apariencia fibroblastoide.

Referencias estadísticas tales como ES, DE van en mayúsculas; n va en minúscula (Media=10.84, DE=2.54, n=50). No deje espacios dentro de las fórmulas matemáticas, ni después o antes de los símbolos igual, mayor, menor (=, <, \geq); r^2 y p se escriben en minúsculas (p<0.001).

El Cuadro 1 nos muestra el promedio del tamaño celular (longitud y amplitud) de las dos morfologías celulares encontradas.

Citoquímica: Con relación a la reacción de PAS, se evidenció un 7.08% de células con gránulos PAS positivo infectadas con *L. panamensis* (Cuadro 2). La Fig. 2A muestra una célula

de *A. aegypti*, con gránulos color magenta en su citoplasma, característico de la coloración de PAS positivo, evidenciando posiblemente la presencia de carbohidratos, principalmente glucógeno y mucinas. Además, se observó un 50.93% de células infectadas con vacuolas que contenían un material que fue positivo a la coloración de PAS, en un ámbito de reacción de débil a fuerte (Fig. 2B). La técnica de la DAB fue negativa para la detección de peroxididasas.

En el Cuadro 2 se observa el porcentaje de células con gránulos PAS positivo, así, como el porcentaje de células con vacuolas que contenían un material que fue positivo a la coloración de PAS, infectadas con el parásito.

Infección celular: La observación de los cultivos celulares de *A. aegypti* infectados con *L. panamensis*, evidenció la presencia de formas amastigotas al interior de vacuolas parasitóforas durante los días tercero, sexto y noveno post-infección (Fig. 3). En la Fig. 4 se observó que en el día seis (18.90%), se presentó el mayor porcentaje de infección con relación a los días tres (14.06%) y nueve (15.59%), pero no se encontraron diferencias significativas según la prueba de Anova (Tukey, $p=0.5$).

La palabra Figura se abrevia “Fig.”. La palabra Cuadro no se abrevia. Para los dos debe seguirse un orden ascendente por números y letras, cuando corresponda. Un ejemplo para citar varias figuras sería: Figs. 1A, 2 y 3.

En el Cuadro 3 se observan los datos obtenidos del proceso de infección de la línea celular de *A. aegypti* con *L. panamensis*. Sólo el porcentaje de promastigotes por células presentó diferencias significativas (Tukey, $p<0.05$) en el tercer día con relación a los días sexto y noveno según la prueba de Anova.

Los resultados estadísticos se presentan brevemente entre paréntesis, con el nombre y valores de p separados por comas (g. l. son opcionales).

Microscopia electrónica de transmisión: Ultraestructuralmente se identificó en las células del cultivo, con y sin infección, la presencia de organelos característicos tales como: núcleo, mitocondrias, vacuolas y lisosomas. Las células de cultivos celulares sin infectar, presentaron un núcleo voluminoso, con poca cromatina condensada que ocupaba la mitad del citoplasma, el cual tenía un aspecto de panal; además se observó la presencia de vacuolas con y sin material fibrilar (Fig. 5A). En las células infectadas, se evidenció la presencia de formas promastigotas en el interior del citoplasma. Igualmente, se logró observar vacuolas con y sin material fibrilar. El núcleo se encontró más al extremo de las células y en la mayoría de observaciones éste se identificó muy eucromático (Fig. 5B). Desde el punto de vista ultraestructural y de citoquímica, se puede sugerir la presencia tanto de lisosomas como de vacuolas con contenido enzimático asociado con carbohidratos.

DISCUSIÓN

La presencia de dos grupos diferentes de células en los cultivos celulares derivados del mosquito *A. aegypti* se debe, posiblemente, a los diversos tipos de tejidos disponibles, a partir de huevos embrionados utilizados durante la formación de los cultivos primarios (Charpentier *et al.* 1995, Rey *et al.* 2000). Sin embargo, predominaron las formas de apariencia epitelioideas,

como lo registró Ardila *et al.* (2005), diferente a lo observado en las líneas celulares Mos. 20 y 29, derivadas de tejidos larvarios de *A. aegypti* que presentaron una morfología en su mayoría fibroblastoide (Varma & Pudney 1969, Ardila *et al.* 2005).

.....

Es importante resaltar que *A. aegypti* no es vector de *Leishmania*, pero sí de otras infecciones que afectan a los animales y al hombre; entre estas tenemos: dengue, fiebre amarilla y filariasis (Brito *et al.* 1999, Harrington *et al.* 2005). No obstante, líneas celulares derivadas de mosquitos han sido utilizadas como posibles modelos *in vitro* para el establecimiento y aislamiento de algunos patógenos, que no están necesariamente relacionados con sus hospederos naturales. Son ilustrativos al respecto, los ejemplos siguientes: en 1973 Mazzola *et al.* (1976, 1979), realizaron la infección de células de *A. albopictus* con *Anaplasma marginale*, en donde se observaron eritrocitos infectados con el parásito, fagocitados por las células de *A. albopictus*, así como formas libres del parásito, en el citoplasma de éstas. En el 2006 Horta *et al.*, reportaron el aislamiento y establecimiento de *Rickettsia felis* en la línea celular C6/36 de *A. albopictus*. Estudios realizados por Dedet & Gaudin (1977), reportan la capacidad de internalización y transformación del parásito *L. donovani* en cultivos celulares derivados del mosquito *A. albopictus*, logrando así su infección.

En el presente trabajo se demostró que las formas promastigotas de *L. panamensis* tienen la capacidad de transformarse en amastigotes en células derivadas de tejidos embrionarios del mosquito *A. aegypti*; lo anterior, fue también observado con las especies *L. chagasi* y *L. braziliensis* en la misma línea celular de mosquito (Muñoz *et al.* 2005). La adhesión e internalización del parásito en estos cultivos celulares, son debidos probablemente, a la posible actividad endocítica o fagocítica de algunas células del mismo cultivo. Lo cual coincide con los hallazgos registrados en células de origen embrionario de *Drosophila*, que permitieron detectar ciertos receptores parecidos al de los macrófagos en mamíferos que actúan en la fagocitosis (Echalier 1997).

...

Los porcentajes de infección hallados en los días tercero, sexto y noveno postinfección, en este estudio, fueron mayores a los observados en cultivos celulares de *A. aegypti* infectados con *L. chagasi*, pero menores en comparación a los infectados con *L. braziliensis* (Muñoz *et al.* 2005). Estas diferencias tal vez sean debidas, al polimorfismo del LPG entre especies de *Leishmania*, lo cual ha demostrado que en condiciones *in vivo*, estas moléculas intervienen en la capacidad de adhesión del parásito con el intestino del vector (Pimenta *et al.* 1994). Por otro lado, el posible éxito de la infección en las células de *A. aegypti*, se debe parcialmente a que la temperatura (26°C) es óptima para el mantenimiento de los cultivos y simultáneamente para los promastigotes de *Leishmania* (Zilberstein & Shapira 1994, Muñoz *et al.* 2005).

Con los hallazgos observados en este trabajo por microscopia de luz y electrónica se confirmó la internalización y transformación del parásito, demostrando la capacidad que tiene las células de este cultivo celular de ser infectadas por *L. panamensis*, lo cual permitiría proponer a este cultivo celular como un posible modelo *in vitro* para el estudio de la interacción parásito-vector.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos son breves y se citan sólo las personas que aportaron significativamente al trabajo. **No** se usan títulos (Dr., Sr., Sra., Don, Doña, etc.).

A Manuel Guillermo Forero por sus conocimientos y capacitaciones para el manejo del software ImageJ. A Cesar Augusto Díaz, por el apoyo brindado para el procesamiento de los resultados. A Andrés Ramírez, por el manejo y mantenimiento de los cultivos celulares y los parásitos. A Colciencias y al Instituto Nacional de Salud por la financiación del joven investigador Alfonso Arturo Miranda H. A la Universidad de La Salle, a la Universidad del Rosario y Colciencias por la financiación del presente trabajo.

“RESUMEN” se titula en mayúsculas, y tiene la misma estructura que el **abstract**, pero debe ser más breve: unas 200 palabras.

RESUMEN

La primera línea celular de *Aedes aegypti* fue establecida por Grace en 1966 y desde entonces se han utilizado para el estudio de virus, bacterias y parásitos. En el presente trabajo se describen, por primera vez, algunas características citoquímicas de los cultivos celulares de *A. aegypti*, infectados con la cepa (MHOM/CO/87CL412) de *Leishmania panamensis*. También se realizó un estudio morfológico de las células del cultivo. Se observaron 30 células pequeñas con apariencia fibroblastoide de $10.84 \pm 2.54 \mu\text{m}$ de largo y $5.31 \pm 1.26 \mu\text{m}$ de ancho; otras 30 presentaron apariencia epitelioide con $23.04 \pm 4.00 \mu\text{m}$ de largo y $13.96 \pm 3.70 \mu\text{m}$ de ancho; éstas últimas predominaron sobre las de apariencia fibroblastoide. De 113 células, un 7.08%, presentaron abundantes gránulos citoplasmáticos positivos con la coloración de PAS, indicando presencia de polisacáridos. La prueba de peroxidasa dio un resultado negativo. El mayor porcentaje de infección (18.90%), de un total de 101 células, se presentó el sexto día. Ultraestructuralmente, las células presentaron un citoplasma con aspecto vacuolado; algunas contenían parásitos, otras material fibrilar y otras estaban vacías. Los resultados indican que los cultivos celulares de *A. aegypti* pueden ser infectados por *L. panamensis* y mantener dicho proceso por aproximadamente una semana.

Las “**Palabras clave**” se ubican tras el Resumen; se escriben en español, en minúsculas y con negrita, como se indica.

Palabras clave: ácido periódico Schiff, cultivos celulares, *Aedes aegypti*, *Leishmania panamensis*, microscopia electrónica de transmisión.

REFERENCIAS

Presente la lista de referencias en formato APA o cualquier otro formato de su gestor de referencias bibliográficas que inicie con el apellido del primer autor.

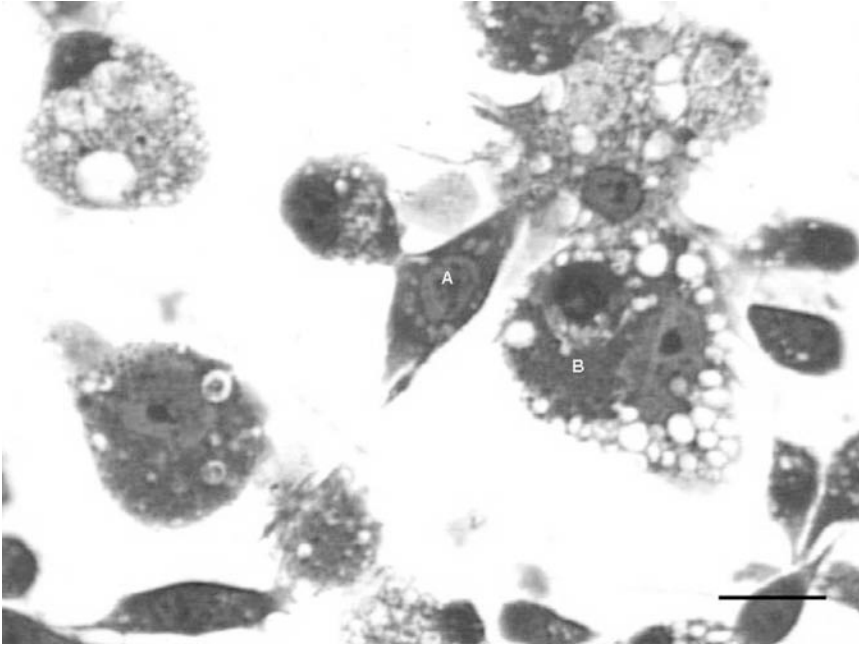


Fig. 1. **(A)** Célula con apariencia fibroblastoide en un cultivo celular de *A. aegypti*. **(B)** Célula con apariencia epitelioid en un cultivo celular de *A. aegypti*. Tinción con Azul de toluidina (bar: 10 μ m).

Fig. 1. **(A)** Cell with fibroblastoid appearance in a cell culture of *A. aegypti*. **(B)** Cell with epithelioid appearance in an *A. aegypti*'s cell culture. Stained with toluidine Blue (bar: 10 μ m).

Como su documento es en español, los pies de figura y los títulos de los cuadros son bilingües.

Los pies de figuras van al final del texto luego de referencias y cuadros. Las rotulaciones se incluyen dentro de la figura, con letras mayúsculas y en negrita (No sobreponer textos a la figura ya colocada en el documento word).

La palabra “CUADRO” va sin negrita y en mayúsculas. Los títulos de los cuadros son breves y sólo los nombres científicos van en cursiva; también incluyen traducción al inglés.

CUADRO 1

Promedio del tamaño celular en cultivos celulares de *A. aegypti*

TABLE 1

Average of the cellular size in cell cultures of *A. aegypti*

Células	Parámetros	N	Promedio (µm)*	Error estándar
Apariencia fibroblastoide	Largo	30	10.84 ± 2.54	± 0.46
	Ancho	30	5.31 ± 1.26	± 0.23
Apariencia epitelioides	Largo	30	23.04 ± 4.00	± 0.73
	Ancho	30	13.96 ± 3.70	± 0.67

* = Promedio ± desviación estándar.

Las explicaciones y los símbolos utilizados en los cuadros aparecen en la parte inferior de los mismos. Se usa negrita sólo para aclaración.

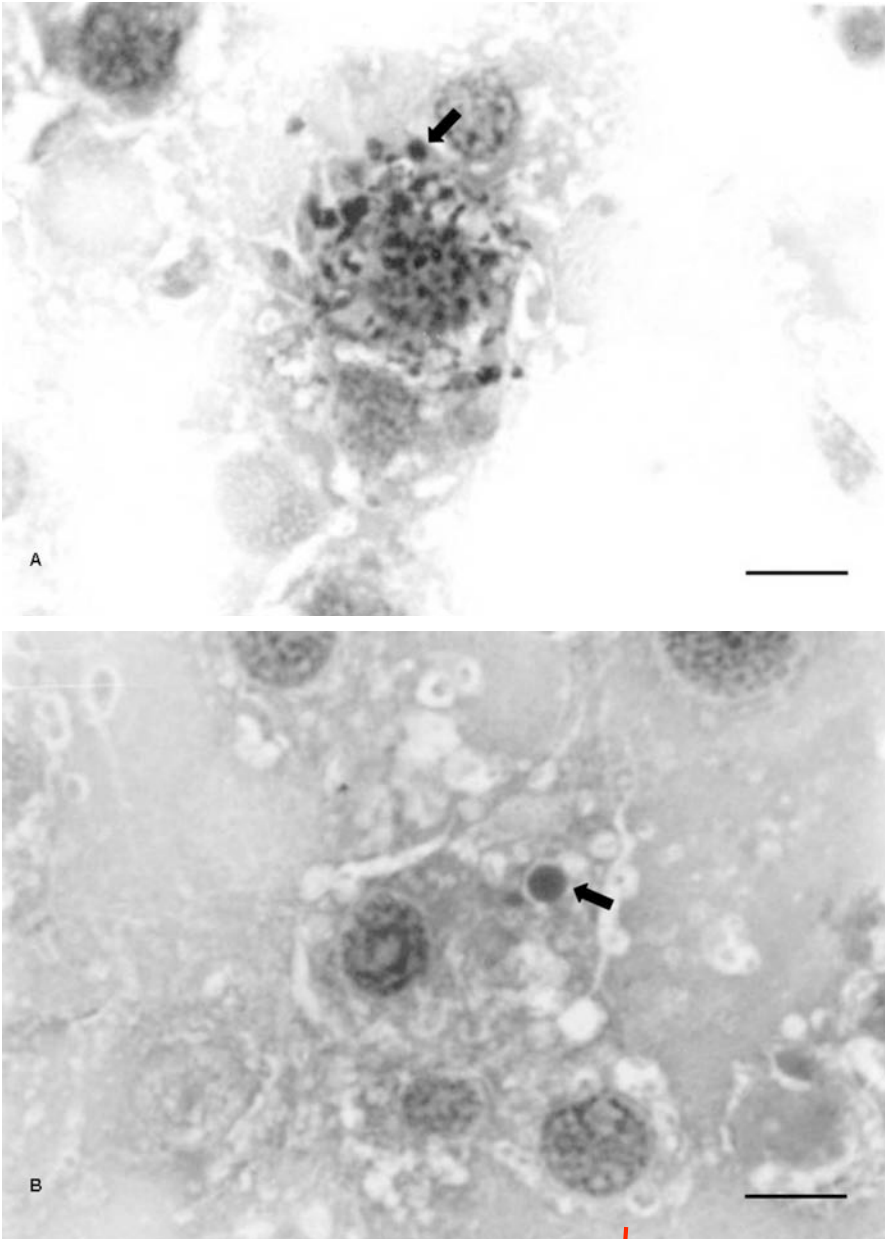


Fig. 2. **(A)** Célula de cultivo celular de *A. aegypti* con gránulos PAS positivo, infectada con *L. panamensis* (flecha). **(B)** Célula de cultivo celular de *A. aegypti*, con vacuola PAS positivo, infectada con *L. panamensis* (flecha) (bar: 10 μ m).

Fig. 2. **(A)** Cell of *A. aegypti*'s cell culture with PAS positive grains, infected with *L. panamensis* (arrow). **(B)** Cell of *A. aegypti*'s cellular culture, with PAS positive vacuole, *L. panamensis* (arrow) (bar: 10µm).

Las fotografías se pueden insertar al final del documento word o en archivos separados; en ambos casos deben estar en formato JPG, ai, psd o TIFF, a una resolución mínima de 300 dpi (alta resolución que se confirma ampliando la figura a pantalla completa y que aún así se vea nítida, no pixelada). Las figuras normales se reducirán a un ancho de 6-12 cm por lo que las rotulaciones deben presentarse en blanco (\$200 por pág).

Los títulos de cuadros son breves (solo los nombres científicos van en cursivas). s deben abrir el costo

CUADRO 2

Promedio de células con gránulos PAS positivo y el promedio de células con vacuolas PAS positivo, en cultivos celulares de *A. aegypti* infectados con *L. panamensis*

TABLE 2

Average of cells with PAS positive grains and the average of cells with PAS positive vacuols, in cell cultures of *A. aegypti* infected with *L. panamensis*

Parámetros	Células/campo	Promedio (%) [*]	Error estándar
Gránulos PAS +	113	7.08 ± 2.73	± 0.25%
Vacuolas PAS +	108	50.93 ± 5.2	± 0.50%

* = Promedio ± desviación estándar.

En los cuadros no se usa negritas o mayúsculas.
Las cifras no llevan comas sino sólo puntos como se muestra.

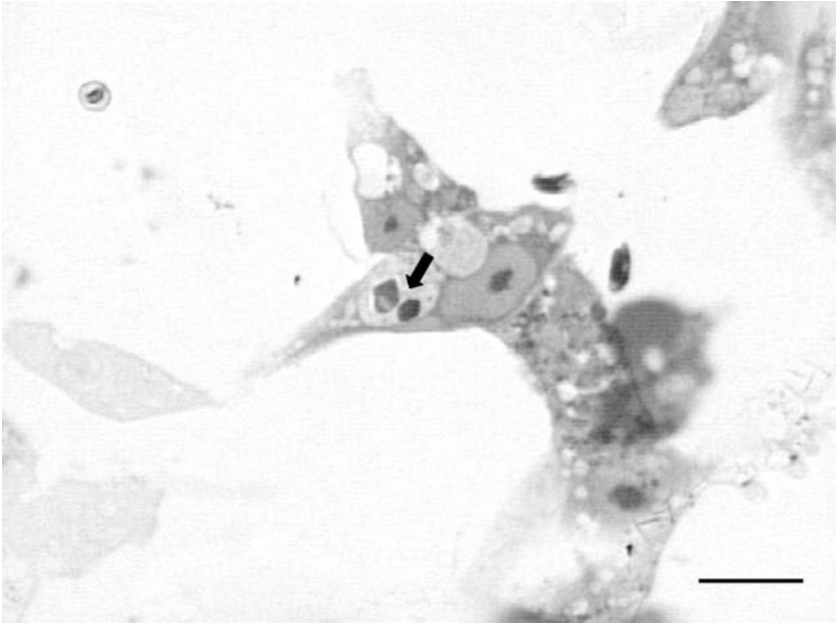
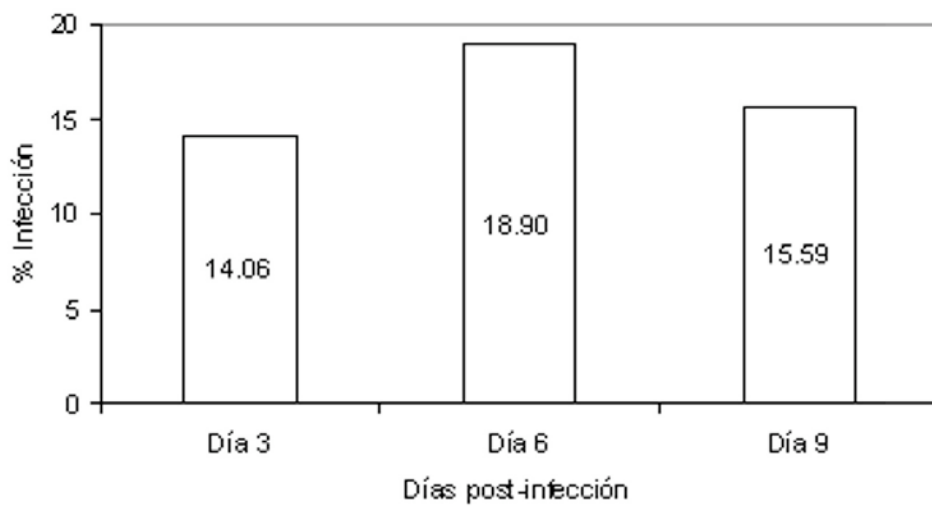


Fig. 3. Células de *A. aegypti* con dos amastigotes de *L. panamensis*, día 3 post-infección (flecha) (bar: 10 μ m).

Fig. 3. Cells of *A. aegypti* with two amastigotes of *L. panamensis*, day 3 post-infection (arrow) (bar: 10 μ m).



Los gráficos van preferiblemente en blanco y negro.

Fig. 4. Porcentaje de infección de células de *A. aegypti* infectadas con *L. panamensis*, los días tres, seis y nueve post-infección.

Fig. 4. Percentage of infection of *A. aegypti* infected cells with *L. panamensis*, days three, six and nine post-infection.

CUADRO 3

Promedio de datos obtenidos durante el proceso de infección

TABLE 3

Average of data collected during the infection process

Día	% Infección*	% Amastigotes /célula*	% Amastigotes /célula*	% Promastigotes/ en contacto*	% Promastigotes/ en contacto*
3	14.06 ± 9.60	18.23 ± 15.66	1.17 ± 0.26	12.63 ± 2.60	1.24 ± 0.43
6	18.90 ± 5.99	15.13 ± 5.98	1.40 ± 0.73	7.17 ± 3.91	0.85 ± 0.37
9	15.59 ± 4.43	13.03 ± 4.40	1.25 ± 0.28	6.52 ± 2.59	1.08 ± 0.16

* = Promedio ± Desviación estándar.

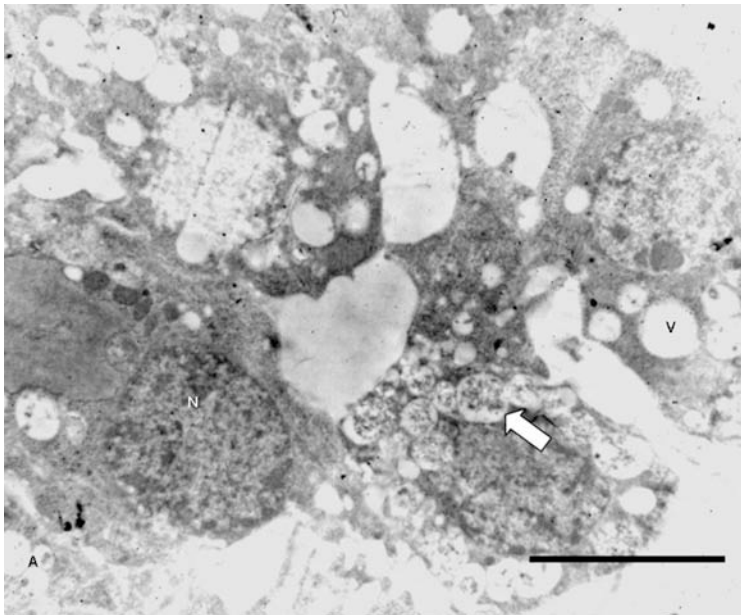


Fig. 5. Células del cultivo celular de *A. aegypti*. **(A)** Células sin infectar, presentando vacuolas vacías (V) y con material fibrilar (flecha blanca). **(B)** Célula infectada con promastigotes (P) de *L. panamensis*, día 3 post-infección. Núcleo celular (N). Lisosomas (flecha negra) (bar: 6µm).

Fig. 5. Cells from *A. aegypti*'s cell culture. **(A)** Noninfected cells, presenting empty vacuoles (V) and vacuoles with fibrilar material (white arrow). **(B)** Cell infected with promastigotes (P) of *L. panamensis*, day 3 post-infection. Nucleus (N). Lysosomes (black arrow) (bar: 6 μ m).

Los pies de Figura también son breves. En caso de tener varias partes, estas van señaladas en negrita y mayúscula, e.g. “**(A)**”.