

# Líneas celulares de dípteros: características, aplicaciones y aportes desde Colombia

## Diptera Cell Lines: Characteristics, Applications and Contributions From Colombia

Ingrid Dayana Jiménez Camacho<sup>1</sup>, Mónica Losada<sup>2</sup>, Héctor Rangel<sup>3</sup>, Anny Karely Rodríguez<sup>2</sup>, Ana Luisa Muñoz<sup>4</sup>, Felio Jesús Bello García<sup>5</sup> y Nidya Alexandra Segura Guerrero<sup>6</sup>

### Resumen

Los cultivos celulares son una herramienta que permite el mantenimiento de células *in vitro* conservando al máximo sus características fisiológicas, bioquímicas y genéticas, los cuales pueden presentar propiedades muy diversas dependiendo de la especie, tejido de origen y el medio de cultivo empleado. El uso de cultivos celulares de dípteros constituye una metodología valiosa en diferentes disciplinas, tales como fisiología, genética, bioquímica y patología; así, por ejemplo, se han podido estudiar diversas enfermedades tanto de interés en medicina humana como en veterinaria. En la presente revisión se presenta información de múltiples líneas celulares del orden Diptera, las cuales se han empleado para llevar a cabo estudios de interacción célula a célula, flujo intracelular de metabolitos, producción de bioinsecticidas, amplificación viral y producción de péptidos antimicrobiano. En Colombia, se han establecido 12 líneas celulares de dípteros las cuales fueron caracterizadas y estandarizadas, algunas de ellas se han empleado como sustratos en estudios del ciclo biológico de parásitos del género *Leishmania*, también, en la evaluación a la susceptibilidad de arbovirus. En esta tendencia, se analiza y discute la información de las líneas celulares derivadas de dípteros con el fin de realizar el presente trabajo de revisión sobre sus características y aplicaciones.

**Palabras clave:** biotecnología, cultivos celulares, diptera, susceptibilidad viral.

### Abstract

Cell cultures are a tool that allows the maintenance of cells *in vitro* preserving their physiological, biochemical and genetic characteristics to the maximum, which can present very diverse properties depending on the species, tissue of origin and the culture medium used. The use of dipteran cell cultures constitutes a valuable methodology in different disciplines, such as physiology, genetics, biochemistry and pathology; thus, for example, it has been possible to study various diseases of interest in both human and veterinary medicine. This review presents information on multiple cell lines of the order Diptera, which have been used to carry out studies of cell-cell interaction, intracellular flow of metabolites, production of bioinsecticides, viral amplification and production of antimicrobial peptides. In Colombia, 12 dipteran cell lines have been established, characterized and standardized, some of which have been used as substrates in studies of the biological cycle of parasites of the genus *Leishmania*, as well as in the evaluation of arbovirus susceptibility. In this trend, the information on cell lines derived from dipterans is analyzed and discussed in order to carry out this review of their characteristics and applications.

**Keywords:** biotechnology, cell culture, diptera, susceptibility, viral susceptibility.

**Recepción:** 09-nov-2022

**Aceptación:** 20-feb-2023

<sup>1</sup>Maestría Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

<sup>2</sup>Ph.D., Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño.

<sup>3</sup>Ph.D., Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

<sup>4</sup>Ph.D., Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Antonio Nariño.

<sup>5</sup>Ph.D., Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medicina Veterinaria, Universidad de la Salle.

<sup>6</sup>Ph.D., Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Correo electrónico: [nidya.segura@uptc.edu.co](mailto:nidya.segura@uptc.edu.co)

## 1 Introducción

Los cultivos celulares integran el primer paso para la caracterización y tipificación de las líneas celulares, entre las cuales podemos indicar: poseer un aumento continuo en el número de células de forma espontánea o inducida, el predominio de uno o dos tipos celulares, conformación del cariotipo, definición del perfil molecular, el crecimiento homogéneo y uniforme, conservando, como línea celular continua, las mismas características a lo largo de las siguientes generaciones [1]. Generalmente, las líneas celulares poseen una vida finita que dependiendo del tipo celular se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones; luego de estos eventos, usualmente las células entran en etapa de senescencia y mueren [2]. Sin embargo, algunas células evaden los controles del ciclo celular, dando lugar a líneas celulares de crecimiento continuo [3], ya sea mediante transformación celular inducida por virus, por la acción de medicamentos o espontáneamente luego de muchos subcultivos [4].

En la actualidad los cultivos celulares de insectos son utilizados en una amplia gama de investigaciones debido a que las proteínas de los insectos son de alta calidad, digestibilidad y constituyen una buena fuente de minerales y aminoácidos esenciales y no esenciales [5, 6]; además, son de fácil manejo debido a que no requieren CO<sub>2</sub> y se mantienen a temperaturas cercanas a los 28 °C; lo que genera gran interés para las industrias dedicadas a diferentes actividades en áreas biomédicas y biotecnológicas [7], en las cuales sobresale su uso como herramienta en la expresión de genes exógenos a partir de moléculas de ADN recombinante, en la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) [8], en el desarrollo del ciclo de vida de parásitos [9], en estrategias antivirales [10], en rutas metabólicas [11] y como sustratos para aislar, propagar e identificar arbovirus, entre otros [4].

La primera línea celular de Dípteros fue establecida en 1966 por Grace, a partir de larvas de *Aedes aegypti* próximas al estado de pupa [12]. Fue además Grace quien también formuló un nuevo medio de cultivo que lleva su nombre, el cual favorece el crecimiento y mantenimiento de líneas celulares derivadas de diferentes especies de insectos. Para el año 2010, en el mundo se habían establecido aproximadamente 500 líneas celulares del orden Diptera;

sin embargo, en la actualidad se desconoce el número real que han sido obtenidas [13]. En Colombia, se han registrado aproximadamente 12 líneas celulares de este orden de insectos, las cuales incluyen especies de interés médico y veterinario; no obstante, hoy en día se continúa en esta labor, debido a sus múltiples aplicaciones y a las necesidades de apoyo que se requieren en diversos campos de investigación, contribuyendo desde nuestro país en el desarrollo de nuevas líneas celulares.

El propósito de esta revisión es presentar un panorama respecto a las diferentes líneas celulares de insectos, discutiendo sus principales características, tales como el tejido y especie de origen, la morfología celular, cariotipo, medios de cultivo empleados y condiciones ambientales y fisicoquímicas de los cultivos celulares, con particular referencia en el conocimiento sobre las líneas celulares de dípteros establecidas en Colombia. Adicionalmente, se incluyen las aplicaciones que dichas líneas celulares han presentado en estudios de interés en medicina humana y veterinaria.

## 2 Características de las líneas celulares de dípteros

### 2.1 Origen del cultivo y cambios genéticos

Debido a la amplia gama de usos de las líneas celulares, tanto a nivel biomédico como biotecnológico, es necesario conocer sus características morfológicas y moleculares, las cuales dependen en gran medida de la especie y el tejido de origen empleado para el cultivo celular [14]. Lo anterior con el fin de autenticar las líneas celulares y garantizar la confiabilidad en los resultados de investigaciones en las cuales estas sean empleadas [15]. Por otra parte, se ha implementado el uso de técnicas moleculares que permiten identificar el origen de las células, mediante la comparación de estudios moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta técnica permite comparar las secuencias de las células con las de la especie de origen del cultivo [16].

Teniendo en cuenta que los cultivos primarios se obtienen por crecimiento de células de un tejido de origen, es de esperar que éstos posean características propias de la fuente de donde derivan. Por ejemplo,

si el cultivo primario proviene de un tejido embrionario los resultados serán comunidades celulares diversas, originadas de células pluripotentes, que dan origen a las poblaciones celulares diversas de los embriones; mientras que, si el cultivo evoluciona de un solo tejido de origen, el resultado registrará poblaciones celulares con muy baja diversidad genética [17]. Sin embargo, es necesario resaltar que el vínculo de dependencia genética con la especie de insecto de donde derivan los cultivos celulares se mantiene, lo cual posibilita su identificación, comparando el tejido de origen con la línea celular, mediante el uso de técnicas citogenéticas y moleculares [18, 19].

Dentro de los factores relevantes que favorecen el buen desarrollo en la etapa de iniciación de los cultivos celulares se encuentran las condiciones nutricionales, a través de medios de cultivos óptimos para la adaptación y proliferación celular, también de temperatura, usualmente 28 °C y de pH adecuados, el cual varía dependiendo del medio de cultivo entre 6.2 y 7.0 [20]. Cuando son suministrados y controlados apropiadamente dichos factores a los cultivos en desarrollo, estos pueden llegar a producir células capaces de realizar mitosis, aumentando así el número de éstas a través de los doblajes poblacionales, dando lugar a un cultivo primario, luego a subcultivos y posteriormente conducir a una línea celular con la capacidad de crecer continuamente [21]. No obstante, las líneas celulares presentan variaciones genéticas, resultando generalmente en aneuploidías, casi siempre con registros de números de cromosomas entre diploides y tetraploides, lo cual es considerado una evidencia de la transformación que puede dirigir la línea celular a la inmortalización [22, 23]; en esta tendencia, por ejemplo, existen tres líneas celulares para la especie *Aedes triseriatus*, las cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones, en medio de cultivo Mitsuhashi-Maramorosch suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20% e incubadas a 28 °C. Estas fueron denominadas GRIP-1, GRIP-2 y GRIP-3 y han sido empleadas para describir las características de crecimiento de los virus La Crosse y trivittatus pertenecientes al orden de los buyavirales. Dichas líneas difieren entre ellas en las proporciones de las ploidias de sus cromosomas. La primera línea celular de esta especie establecida a partir de huevos embrionados de 7 días de incubación mostró 42% de células diploides

y 47% tetraploides, mientras que GRIP-2 y GRIP-3 establecidas a partir de homogenizados de larvas recién nacidas de la misma especie se caracterizaron por tener 63% y 59% de células diploides y 31% y 37% de células tetraploides [11]. En contraste, otra línea celular establecida con larvas neonatas de la misma especie en 1984, presentó solamente células diploides (Tabla 1) [24]. Otro caso de cambio genético en líneas celulares de la misma especie se produjo en *Aedes aegypti*, por ejemplo, para esta especie se estableció una línea a partir de homogenizados de larvas a punto de convertirse en pupas, con medio Grace e incubadas a 30 °C, donde se observó que la mayoría de las células eran poliploides y no se encontraron células diploides, además, la mayoría presentó complemento cromosómico de 16 n, con una máximo de 32 n [12]; contrario a este evento, en otra línea celular establecida de huevos embrionados de esta misma especie y mantenida con Grace y L-15 (1:1), se observó en el subcultivo 60 que la población celular presentó en un 19% aneuploidías, 16% de triploidias y tetraploidias, siendo las más representativas las trisomías y monosomías [25].

Cabe anotar que solo en uno de los anteriores trabajos se mencionó el número del subcultivo seriado empleado para establecer la ploidia celular, la cual puede estar fuertemente influenciada por la edad de la línea en pases altos [26]. Por otra parte, las diferencias mostradas entre las líneas de la misma especie sugieren que iniciar líneas celulares de insectos puede ser una cuestión no solo de seleccionar el tejido de origen, sino también podría estar relacionada con un rango estrecho de horas dentro de cada estado de desarrollo biológico de dicho tejido, lo cual puede conllevar a obtener células con diferentes características [27].

### 3 Morfología y tipo de crecimiento

En cuanto a la morfología celular, las células de insectos tienden a tener tamaños pequeños, que van desde 17 hasta 30 µm, en relación con las células de mamífero, que usualmente se encuentran entre 10 y 100 µm. Sin embargo, la variable tamaño depende del ciclo celular y de las condiciones de crecimiento [28]. Se ha reportado que el tamaño de las células de mamíferos bajo condiciones *in vitro* puede ser entre 300 y 500% mayor que su contraparte *in vivo*

[29]. No obstante, aún se desconoce el efecto de las condiciones *in vitro* en células de insectos.

Se ha observado que la mayoría de las líneas celulares presentan células epiteloides, fibroblastoides, redondas y en menor proporción en forma de uso con diferentes tamaños dependiendo de la especie y el tejido de origen, por ejemplo la línea celular establecida a partir de larvas jóvenes de *Anopheles stephensi*, presentó principalmente células de tipo epiteliales con diámetros entre 4 a 9  $\mu\text{m}$  y de 12 a 20  $\mu\text{m}$  [27], por el contrario la línea celular establecida en 1971 para la misma especie, pero a partir de cortes extremos de larvas, presentó en fases avanzadas células de tipo fibroblastoide y epitelioide en menor proporción; sin embargo, no se mencionó su tamaño. Además, en ambas líneas celulares no se observaron cambios en el complemento cromosómico, el cual se mantuvo diploide con tres pares de cromosomas [30] (Tabla 1). Otro ejemplo son dos líneas celulares de *Culex tritaeniorhynchus*, establecidas a partir de tejido embrionario, en la primera línea celular se observó que en el pase 45 se dio origen a cuatro tipos celulares: epitelial, tipo fibroblastoide, gigantes y células vacuoladas [31], mientras que la segunda línea de la misma especie denominada NIID-CTR, mostró en fases altas dos tipos celulares: en forma de huso y redondas [32]. En los dos casos anteriores, las líneas celulares se mantuvieron diploides ( $2n = 6$ ) en los estudios cariológicos.

Este tipo de estudio de caracterización es importante ya que permite la autenticación de líneas celulares mediante cariotipos, así como con enfoques inmunohistoquímicos, los cuales son relevantes, ya que por ejemplo en la década de 50 y principios del 60, hubo aumento de la contaminación cruzada en diferentes laboratorios del mundo. En 1966 se estudiaron 18 líneas celulares humanas, las cuales se encontraban contaminadas con células HeLa, causando así pérdidas económicas, de tiempo y peor aún resultados erróneos en investigaciones [15]. Sin embargo, en todas las líneas de insectos presentadas en esta revisión, se realizaron estudios cariológicos (Tabla 1); no obstante, este no es el único método para la autenticación de líneas celulares, constituye un buen criterio para identificar líneas celulares y relacionarlas a nivel taxonómico, además permite distinguir entre células normales y transformadas [14]. Otros métodos empleados para la caracterización y autenticación de líneas celulares

de insectos incluyen técnicas moleculares, tales como: DNA fingerprinting, DNA profile, RAPD-PCR, análisis de ADN para la detección de contaminación intraespecies [15; 14] y datos derivados de diferentes tipos de secuenciación de nueva generación (NGS) [33], las cuales, la mayoría individualmente, se han implementado con el fin de garantizar la identidad celular y, además, consecuentemente, se recomienda monitorear el estado de las líneas celulares que se emplean en los laboratorios periódicamente.

Por otra parte, en cuanto al crecimiento celular existen dos tipos: el primero es en monocapa, el cual consiste en la capacidad de adherencia que presentan las células a una superficie de crecimiento; esta propiedad está relacionada con el tipo de células de las cuales se derivan los cultivos y depende, también, del tipo de proteínas presentes en su superficie, que incluyen proteínas de la matriz extracelular, las cuales se encargan de mantener unidas a las células y regular el crecimiento de las mismas *in vivo*. Macromoléculas como el colágeno, la fibronectina, la laminina y proteoglicanos, permiten establecer interacciones con las proteínas de la membrana citoplásmica de la célula, denominadas moléculas de adhesión celular (CAMs), cadherinas e integrinas, esta última permite la adhesión en los cultivos en monocapa por medio de adhesiones focales; donde las células crecen hasta que cubren la superficie de soporte y establecen contacto entre las células, lo cual causa inhibición por contacto y detención del ciclo celular [14]. El segundo tipo de crecimiento es en suspensión, en el cual las células no se encuentran adheridas a una superficie sino dispersas en el medio, tal como ocurre corrientemente con células de la hemolinfa y sanguíneas o en cultivos celulares transformados donde las células han perdido o disminuido la síntesis de proteínas de anclaje y no desarrollan inhibición por contacto, particularmente como se ha registrado en algunas líneas celulares transformadas artificialmente [34, 35, 36]. En general, aunque la mayor parte de las líneas celulares de insectos crecen adheridas a una superficie, existen algunas líneas que han sido adaptadas para crecimiento en suspensión, como la línea Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) [37], la línea de *Drosophila melanogaster* (Diptera), proveniente de músculo adulto de la especie, que han sido empleadas en estudios de bioingeniería [38].

Tabla 1: Líneas celulares de insectos y sus principales características

Especie	Tejido de origen	Morfología y complemento cromosómico	Autores
<i>Aedes aegypti</i>	Larvas a punto de pupación	Forma de uso y redondas 6 cromosomas	Grace 1966 [12]
<i>Aedes aegypti</i>	Tejidos embrionarios	Formas esféricas pequeñas y en pases altos de forma epitelial 6 cromosomas	Ardila et al 2005 [25]
<i>Aedes aegypti AEGY-28</i>	Tejidos embrionarios	Epitelial 6 cromosomas	Castañeda et al 2007 [19]
<i>Aedes albopictus C6/36</i>	Larvas recién eclosionadas	Redondas 6 cromosomas	Singh 1967 [39]
* <i>Aedes albopictus C6/36HT</i>	Larvas recién eclosionadas	Redondas 6 cromosomas	Kuno G & Oliver A. 1989 [40]
<i>Aedes dorsalis</i>	Tejidos larvales recién eclosionadas	Células epiteliales y fibroblastos 6 cromosomas	Cahoon 1978 [41]
<i>Aedes pseudoscutellaris AP-61</i>	Larvas de primer estadio	Células epiteliales y redondas Poliploides con 12 cromosomas en su mayoría	Varma et al 1974 [42]
<i>Aedes pseudoscutellaris Sublinea CLA-1</i>	Larvas	Células pequeñas alargadas Células AP-61	Morier et al 2014 [43]
<i>Aedes pseudoscutellaris Sublinea CLA-HT</i>	Larvas	Células pequeñas alargadas y redondas Células AP-61	Morier et al 2014 [43]
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	Tejidos embrionarios	Epitelial 6 cromosomas	Bello et al 1995 [44]
<i>Aedes triseriatus</i>	Tejido larval neonatal	Células tipo fibroblastos 6 cromosomas	Rowley et al 1984 [24]
<i>Aedes triseriatus GRIP-1</i>	Huevos embrionados de 7 días	Células fibroblastos 42% células diploides y 47% tetraploides	Charpentier et al 1995 [11]
<i>Aedes triseriatus GRIP-2</i>	Homogenizados de larvas recién nacidas	Fibroblastos y epitelial 63% diploides 31% tetraploides	Charpentier et al 1995 [11]
<i>Aedes triseriatus GRIP-3</i>	Homogenizados de larvas recién nacidas	Fibroblastos y epitelial 59% diploides 37% tetraploides	Charpentier et al 1995 [11]
<i>Aedes krombeini</i>	Huevos embrionados	Epitelial 83%, fibroblastos 15%, gigantes y vacuoladas 2%, 6 cromosomas	Pant et al 1992 [45]
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	Tejido embrionario	Epitelial, fibroblastos, gigantes y vacuoladas 6 cromosomas	Athawale et al 2002 [31]
<i>Culex tritaeniorhynchus NIID-CTR</i>	Embrión de la especie	Células en forma de huso y redondas 6 cromosomas	Kuwata et al 2012 [32]
<i>Culex theileri</i>	Huevos embrionados	Redondas o fibroblastos 6 cromosomas	Oelofsen et al 1990 [46]
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Tejido ovárico	Huso y redondas	Hsu et al 1970 [47]

Continúa

Tabla 1. *Continuación*

Especie	Tejido de origen	Morfología y complemento cromosómico	Autores
		6 cromosomas	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Tejido embrionario	Células heterogéneas con predominio epitelial	Segura et al 2012 [18]
		6 cromosomas	
<i>Anopheles albimanus</i>	Tejido y huevos embrionarios	Epitelial gigantesca y fibroblastos	Bello et al 1997 [48]
		6 cromosomas	
<i>Anopheles stephensi</i> var. <i>mysorensis</i>	Vesículas de células producidas por las piezas larvarias	Epitelial	Schneider 1969 [27]
		6 cromosomas	
<i>Anopheles stephensi</i> var. <i>mysorensis</i>	Cortes de extremos de larvas	Epitelial, células de tipo fibroblastos	Pudney & Varma 1971 [30]
		6 cromosomas	
<i>Anopheles gambiae</i>	Larvas	Epitelial	Marhoul & Pudney 1972 [49]
		6 cromosomas	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Tejido embrionario	Epitelial y fibroblastos 8 cromosomas	Tesh y Modi 1983 [50]
<i>Lutzomyia longipalpis</i> (LULO)	Tejido embrionario	Células heterogéneas, alargadas, esféricas, irregulares, pequeñas y con vesículas	Rey et al 2000 [51]
		8 cromosomas	
<i>Lutzomyia spinicrassa</i>	Huevos embrionados y larvas neonatas	Fibroblastos y epitelial	Zapata et al 2005 [52]
		8 cromosomas	
<i>Lutzomyia shannoni</i>	Larvas neonatas	Células epitelioides	Bello et al 1997 [53]
		8 cromosomas	
<i>Psorophora confinnis</i>	Huevos embrionados	Epitelial	Bello et al 2001 [54]
		6 cromosomas	
<i>Lucilia sericata</i>	Huevos embrionados	Células nerviosas y en menor proporción epitelial	Echeverry et al 2009 [55]
<i>Sarconesiopsis magellanica</i>	Tejido embrionario	Fibroblastos y en menor proporción epitelioides.	Cruz et al 2012 [19]
<i>Sarcophaga peregrina</i> NIH-SaPe-4	Tejidos embrionarios	Morfología celular heterogénea	Takahashi et al 1980 [56]
		12 cromosomas	
<i>Calliphora vicina</i>	Tejidos embrionarios	Fibroblastos	Pinillos et al. 2022 [57]
		12 cromosomas	
<i>Batrocera dorsalis</i>	Tejidos embrionarios	Redondas	Zheng L2021 [58]
		12 cromosomas	
<i>Culicoides nubeculosus</i> CNE/LULS44	Tejidos embrionarios	Células alargadas y agrupadas diploides de $2n = 6$	Bell et al 2020 [59]
<i>Culicoides nubeculosus</i> CNE/LULS47	Tejidos embrionarios	Células pequeñas, epiteliales y en forma de huso y vesículas flotantes diploides de $2n = 6$	Bell et al 2020 [59]

#### 4 Factores nutricionales de los cultivos celulares

Un principio que se ha tenido en cuenta en la elaboración o modificación de medios de cultivo, destinados a la adaptación, proliferación y crecimiento de cultivos celulares *in vitro* de dípteros, es la composición de la hemolinfa. Sin embargo, sigue siendo un factor crítico para establecer con éxito los medios de cultivo, ya que estos proveen a las células de sales inorgánicas de importancia metabólica en las concentraciones adecuadas para mantener la presión osmótica en condiciones similares a la de las células *in vivo*. El bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) es un metabolito principal, que está presente en medios como Grace, Schneider, y DMEM entre otros; ampliamente utilizados para el establecimiento de líneas celulares de insectos; en estos medios el  $\text{NaHCO}_3$  actúa como buffer, con el fin de mantener el pH de los medios cercano a sus valores normales y para que estos no generen interferencia con los procesos químicos y/o bioquímicos que ocurren en las células, constituyendo una variable importante ya que los productos del metabolismo celular son de naturaleza ácida y se requiere en el mantenimiento del pH óptimo en el cultivo celular que favorezca la actividad enzimática y se evite así el mal funcionamiento celular [60, 61].

Otros componentes de los medios de cultivo celular son los aminoácidos esenciales que favorecen la diferenciación celular y la síntesis de ADN durante el ciclo celular. Además, componentes como la glucosa en el caso de los medios Grace y DMEM y la dextrosa en Schneider proveen energía al cultivo celular con el fin de sintetizar ATP y cumplir sus funciones [62].

Adicionalmente, los medios de cultivo se suplementan con suero fetal, que proporciona una buena fuente de lípidos como: colesterol, fosfolípidos, triacilgliceroles, ácidos grasos, vitaminas lipídicas solubles y sus variantes esterificadas [61]. Existen sueros provenientes de especies como cabra, que proporciona valores de proteína aproximados de 0.77 g/ml, caballo 0.63 g/ml, conejo 0.55 g/ml y SFB 0.45 g/ml. Aunque el SFB brinda los valores de proteínas más bajos, este es el suero de predilección, ya que es de más fácil obtención debido a la comercialización de los bovinos.

#### 5 Aplicaciones de líneas celulares de dípteros

Las líneas celulares derivadas de mosquitos vectores proporcionan una herramienta relativamente simple para investigar la interacción entre el huésped y los virus transmitidos por mosquitos (Figura 1), la más empleada es la línea clonal C6/36, derivada de cultivos celulares obtenidos a partir de larvas recién eclosionadas de *Aedes albopictus*, utilizada, por ejemplo, para demostrar el mecanismo de entrada celular del virus del dengue (DENV) serotipos 1, 3 y 4, mediante inhibidores bioquímicos (cloruro de amonio, clorpromazina, dansilcadaverina y dynasore) de las proteínas clatrina y dinamina, mediante estos ensayos se logró establecer que la entrada de los virus en las células ocurre por endocitosis mediada por clatrina dependiente de pH ácido, estudiados mediante titulaciones de infectividad [63]. En contraste, se estableció que para la misma línea celular la entrada de DENV2 se encuentra mediada por receptores, seguido de endocitosis dependiente de clatrina y pH ácido para el desnudamiento del virus [64]. Este tipo de investigaciones tienen gran potencial para entender el proceso de entrada del virus, así como establecer mecanismos para bloquear la entrada viral a las células. Otros estudios realizados en esta línea celular, han detectado la presencia de genomas defectuosos de DENV-2 luego de la infección persistente. En este caso, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se demostró la presencia de la proteína viral E asociada con sincitios celulares en el cultivo, los cuales contenían estructuras de membrana dispuestas en forma circular y en algunos casos presentaban lisis, además, las partículas virales se encontraron exclusivamente en vacuolas localizadas en el citoplasma, proporcionando así información valiosa sobre los mecanismos a través de los cuales los arbovirus establecen y mantienen infecciones *in vivo* [65].

Estudios similares de infección con el DENV se han llevado a cabo en diversas líneas, un ejemplo, son las sublíneas derivadas de la línea celular AP-61, denominadas CLA-1 y CLA-1 HT establecidas a partir de *Aedes pseudoscutellaris* (Tabla 1) [44, 43]; las cuales se adaptaron a crecer a 33 °C y se infectaron con los cuatro serotipos del DENV, donde demostraron ser más susceptibles a este virus, detectando la

infección por los cuatro serotipos pasadas 96 h pi en estas sublíneas. Demostrando ser útiles debido a su eficiencia para el aislamiento directo y proporcionando una ventaja sobre otras líneas celulares, ya que ofrecen una respuesta rápida a la infección, sumado a esto, CLA-1 y CLA-1 HT no requieren CO<sub>2</sub> y el medio empleado para el crecimiento (L-15) no necesita adición de bicarbonato de sodio como tampón [43]. Otra línea celular de interés médico es la establecida a partir de *Culex tritaeniorhynchus*, la cual resultó ser eficiente para la replicación de DENV1, DENV2 y del virus de la encefalitis japonesa (EJV) las cepas Mie/41/2002 y JaGAR-01, las cuales se estudiaron mediante ensayo de plaqueo usando como matriz células Vero, durante dicho ensayo fue evidente la presencia de unidades formadoras de placas (UFP) desde el primer día para los dos virus estudiados [32]. Además, las líneas celulares de dípteros presentaron susceptibilidad a otros arbovirus. Por ejemplo, la línea celular de *Aedes aegypti* mostró ser altamente susceptible al virus Chikungunya (CHIKV) [66], la línea AP-61 fue susceptible al EJV y al virus del Nilo Occidental (WNV) [67], la línea celular de *Aedes krombeini* fue susceptible a CHIKV, así como a los virus Sindbis (SINV), DENV y WNV, muchos de los cuales afectan a los humanos.

Por otro lado, algunas líneas de Diptera han resultado pobremente susceptible o refractarias a la infección por arbovirus, por ejemplo, la línea celular Lulo del flebótomo *Lutzomyia longipalpis* fue pobremente susceptible a la infección por DENV2 a altos MOIs, por lo cual esta línea celular puede ser considerado una herramienta para entender los mecanismos a través de los cuales la célula puede evadir la replicación viral [68]. Al igual que esta línea celular, otras líneas celulares establecidas a partir de insectos, como CNE/LULS44 y CNE/LULS47, establecidas a partir de *Culicoides nubeculosus*, donde se estudió la replicación del virus lengua azul (familia Reoviridae), mediante la infección con dos cepas del virus BTV-1 (transmitida por el mosquito *C. nubeculosus*) y BTV-26 (no transmitido por insectos), se pudo observar que las células fueron susceptibles a la cepa BTV-1, pero refractarias a la cepa BTV-26, este tipo de células facilita la comprensión de los mecanismos de infección y liberación que subyacen a la competencia del vector y la transmisión del virus el cual

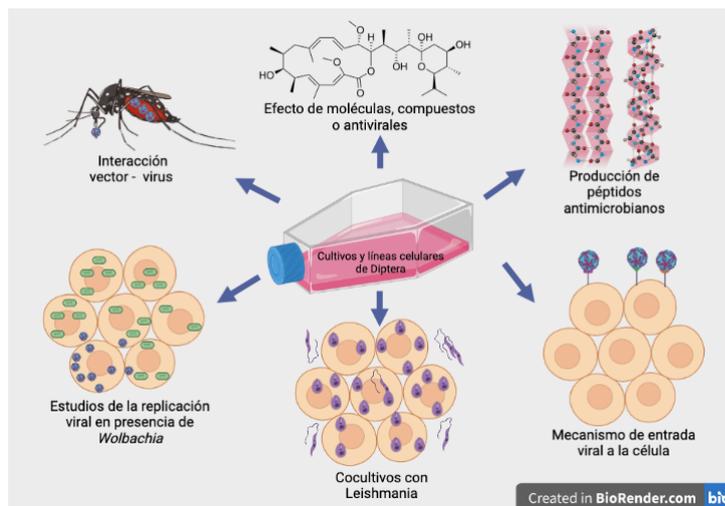
afecta a bovinos [59]; finalmente, otro ejemplo, de líneas celulares refractarias es AEGY-28, establecida a partir de *Ae. aegypti*, la cual resultó refractaria a la infección por FAV y DENV2 y se infirió como explicación a dicho evento que pudo estar asociado a la falta de tripsina en el cultivo celular, en razón a que en la infección natural la tripsina ofrece un clivaje proteolítico en la superficie del virión, facilitando la infección [69]. Lo anterior demuestra que la existencia de líneas celulares refractarias a la infección por virus, también juegan un papel importante en estudios relacionados con la comprensión de los mecanismos intrínsecos de la infección.

Las líneas celulares de insectos han jugado un papel importante en el descubrimiento de flavivirus específicos de insectos (ISF), los cuales no tienen ningún huésped reservorio vertebrado conocido y solo se ha identificado que afectan directamente a mosquito [Contreras & Uribe 2014]. Sin embargo, los ISF al estar asociados con el microbioma de los insectos pueden alterar la competencia de los insectos vectores mediante la modulación de las respuestas inmunitarias del hospedero, compitiendo con arbovirus por recursos y secretando factores anti-virales [71, 72]. Un ejemplo de este tipo es el virus agente de fusión celular (CFAV), el cual se descubrió por primera vez en la línea celular *Ae. aegypti* en 1975 [73]. Un estudio realizado en las líneas Aa20 sin infección con el CFAV y Aag2 con infección natural al mismo virus, buscaba reducir la replicación de este virus mediante la aplicación de RNAi contra el gen NS5; no obstante, al eliminar el tratamiento el virus tuvo una restauración rápida. Curiosamente, al infectar las líneas celulares con DENV y CFAV, se observó una interacción positiva que mejoró significativamente la replicación de DENV y viceversa, esto se debe a que la infección por CFAV aumenta la expresión de ribonucleasa kappa (RNASEK), la cual promueve la infección de virus que dependen de endocitosis y la entrada dependiente del pH por lo cual se aumenta la replicación del DENV [74]. Esto genera repercusiones secundarias ya que la presencia de CFAV mejora la replicación de arbovirus causantes de epidemias como el DENV [75]. Otros ISF descritos y caracterizados a partir de líneas celulares de insectos son: Quang Binh aislado de *Cx. tritaeniorhynchus* [76], el virus del río Kamiti de *Ae.*

*macintoshi* [77], virus Nakiwogo de *Mansonia africana* [78] y virus Calbertado de *Cx. tarsalis* [79, 80] en los cuales se han realizado estudios de interacción entre falvivirus de interés médico y ISF.

Por otra parte, las células de insectos también se han utilizado para determinar la eficacia de especies de bacterias como inhibidores de virus (Figura 1); un ejemplo es *Wolbachia pipientis* una bacteria endosimbiótica presente en especies de insectos que bloquea la replicación de varios flavivirus patógenos. Esta bacteria se probó inicialmente en la línea celular Aag23 de *Ae. albopictus*, la cual se infectó con el DENV-2 y presentaba diferentes densidades de *Wolbachia pipientis*; en este estudio se evidencio que las copias del genoma del DENV-2 en las células aumentó cuando disminuía la densidad de *Wolbachia* [81]. Estudios similares se realizaron con diferentes cepas de *Wolbachia* como inhibidor de arbovirus de la familia Flaviviridae como CHIKV y Zika (ZIKV). Dentro de las cepas estudiadas, se encontró que WAlb es capaz de reducir las tasas de infección por ZIKV infectados por vía oral, pero no en *Ae. aegypti* con infección intratorácica por ZIKV e infección oral/ intratorácica por DENV [82]. Por otra parte, las cepas de WMelPop y WMelPop-CLA confieren protección inmunológica contra DENV y CHIKV, mientras que las cepas WMel y WMelpop mediante la alteración de contenidos de lípidos y colesterol bloquean al DENV y ZIKV [83, 84, 85, 86, 87, 88]; WMel también resulto ser eficiente en la reducción de ZIKV [89] y el DENV [90, 91]. No obstante, todas las cepas de *Wolbachia* han demostrado ser eficientes en la reducción de flavivirus, por ejemplo, WPip en *Ae. aegypti* no mejoró la inmunidad innata del mosquito contra el DENV [86]. En Colombia, actualmente, se han implementado programas de liberación masiva para establecer a *Wolbachia* diferentes comunidades; la primer liberación se llevó a cabo en el municipio de Bello, Antioquia, por un periodo de dos años iniciando en el 2015; debido a los resultados obtenidos en este estudio piloto, se han realizado liberaciones a gran escala en Medellín, Itagüí, Sabaneta y Cali; donde se espera establecer no solo la reducción del dengue, sino también la de arbovirus como CHIKV y ZIKV [92].

Otra aplicación de las líneas celulares de mosquitos es el uso de estas, para determinar la eficacia de compuestos o tratamientos antivirales y comprender la ruta de infección de los virus (Figura 1), un ejemplo, es el estudio realizado en células C6/36 donde se evaluó la eficiencia de bafilomicina A1 contra el virus EJ, donde se evidenció su capacidad para inhibir el crecimiento del virus JE y la fuerte relación existente entre la acidez intracelular y la etapa inicial de la infección por el virus de la EJ en las células C6/36 y Vero [93]. Otros compuestos evaluados para establecer su potencial como inhibidores virales, es el Sofosbuvir, el cual inhibe la polimerasa y fue aprobado por la Federación de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, contra el virus de la hepatitis C y a su vez es eficiente inhibiendo la polimerasa de Flavivirus con material genético de tipo ARN, como el ZIKV, DENV y YFV [94, 95, 96, 97] e interactuó con la proteína no estructural NsP4 del CHIKV, con el objetivo de disminuir la producción viral [98]; Por otra parte, la Suramina, un fármaco antiparasitario aprobado en Alemania, presentó actividad inhibitoria en la síntesis de ARN del CHIKV [99]; además, suprimió la replicación de ZIKV al interferir con la unión y liberación del virus a las células huésped [100]. No obstante, las líneas celulares de insectos también han sido empleadas para el estudio de virus de interés veterinario como el virus de la Estomatitis vesicular (VSV), peste equina africana (PEA) y EJ [46]; la línea celular obtenida de la especie *Culex theileri*, la cual es susceptible al virus de la fiebre del Valle del Rift (RVF) que afecta principalmente a bovinos [46]. Estos estudios, resaltan el amplio uso de las líneas celulares de insectos no solo en el ámbito médico, con la prueba de medicamentos de interés contra virus implicados en epidemias sino también en el campo de la medicina veterinaria [101].



**Figura 1.** Usos y aplicaciones de líneas celulares de dípteros.

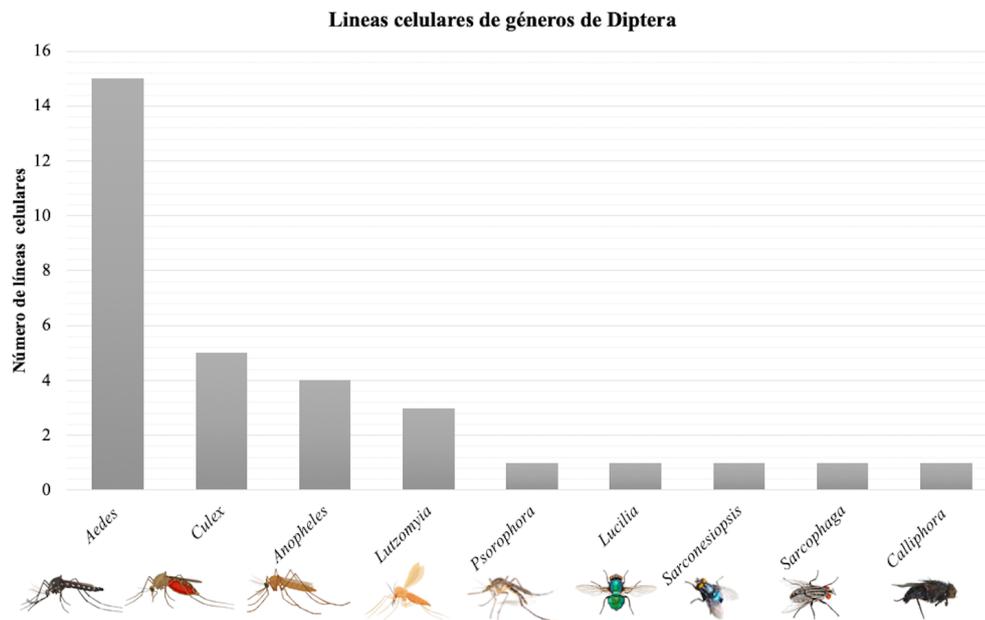
Finalmente, en cuanto a los péptidos antimicrobianos (AMP) provenientes de insectos, el primer péptido inducible de insectos se obtuvo de la hemolinfa de especie *Hyalophora cecropia* en 1980, el cual recibió el nombre de Cecropinas y de las cuales se han descrito aproximadamente 150 péptidos provenientes de insectos agrupados en 4 familias:  $\alpha$ -helicoidales (Cecropinas y moricina) péptidos con cisteína (defensina de insectos y drosomicina), péptidos ricos en prolina (apidaecina, drosocina y lebecina) y polipéptidos ricos en glicina (atacina y guanterina), con actividad contra bacterias grampositivas, gramnegativas y diferentes tipos de hongos [102, 103, 104]. En el orden Diptera se han identificado principalmente péptidos ricos en cisteína, en *Sarcophaga peregrina* se identificaron por primera vez como Sapecinas, las cuales contenían seis tipos de cisteínas que mostraron similitudes con las defensinas de los mamíferos y se denominaron defensinas de los insectos [105], en *Ae. aegypti* se detectaron defensinas A y B en la hemolinfa [106], las cuales tienen capacidad antibacteriana mediante la formación de canales con la membrana citoplasmática [107] y la interacción con fosfolípidos que inducen micro heterogeneidad en la membrana lipídica [108], causando daños en las bacterias. Además de su poder antibacterial y antifúngico, otros estudios de AMPs de insectos han demostrado su capacidad anticancerígena, mediante el uso de la hemolinfa y el cuerpo graso del tercer estadio larvario de *Sarcophaga argyrostomase* en células de cáncer de mama humano (MDA-MB-231),

donde se evidenció que al aumentar las concentraciones hemolinfa y grasa corporal, se observó una correlación negativa con el porcentaje de viabilidad de células tumorales; esto se asocia al aumento de los AMPs en el tejido graso de los insectos (equivalente al hígado en mamíferos) como respuesta a los daños del tejido, evidenciando su actividad antimicrobiana y anticancerígena en células MDA-MB-231 [109]; otro estudio, donde se evaluó la producción de AMPs en tejido graso junto con células de hemolinfa de la especie *Calliphora vicina*, la producción de AMPs se estudió en cultivos celulares de esta especie; dentro de los resultados obtenidos, sugieren que las muestras evaluadas (cuerpo graso y las células sanguíneas), donde el cuerpo graso produce una defensina, cuatro dipterinas, una cecropina y un péptido rico en prolina. Mientras que los hemocitos presentaron al menos una defensina, una dipterina, una cecropina y un péptido rico en prolina los cuales concuerdan con los AMPs maduros presentes en la hemolinfa; adicionalmente, la mayor parte de los materiales antimicrobianos se origina en la grasa corporal y en menor proporción en los hemocitos [110]. Estos estudios demuestran la importancia de continuar estudiando la producción de AMPs de insectos, con el fin de explorar sus potenciales usos en medicina.

## 6 Aportes realizados en Colombia

Globalmente, a la fecha, se han registrado aproximadamente 500 líneas celulares de diferentes especies de dípteros [13], entre los cuales sobresalen los géneros *Aedes* con el mayor número de líneas celulares establecidas, seguido de *Culex* y *Anopheles* (Figura 2).

En América Latina, Colombia ha tenido una participación importante en el desarrollo de líneas celulares de insectos, se han reportado 12 líneas celulares provenientes de diferentes géneros de Diptera, derivadas de mosquitos, flebótomos y moscas necrófagas de la familia Calliphoridae.



**Figura 2.** Líneas celulares de dípteros establecidas de cada genero.

En Colombia, la línea celular Lulo fue establecida a partir de larvas neonatas de *Lutzomyia spinicrassa*, inicialmente el cultivo evolucionó y formó una monocapa confluyente 180 días después del explante y se caracterizó por presentar células de tipo fibroblastoides y epitelioides. La línea es mantenida en medio L-15 a 28 °C. Dicha línea celular fue empleada para permitir el desarrollo del parásito *Leishmania braziliensis* (Figura 1), causante de leishmaniasis cutánea en Colombia. Para tal fin, monocapas subconfluentes se infectaron con la cepa MHOM/CO/86/CL250 de *L. braziliensis*, donde se observaron formas promastigotas, sugiriendo la entrada del parásito a las células, además de la transformación en formas similares a las amastigotas dentro de ellas, demostrando la capacidad de estos cultivos como modelo para estudiar el ciclo de vida de *L. braziliensis*, así como identificar herramientas para establecer posibles mecanismos conducentes a la eliminación y control del protozoo [52].

Por otro lado, se estudió la susceptibilidad de la línea celular Lulo a la infección por los virus Mayaro (MAYV) (familia Togaviridae), Ilheus (ILHV) (familia Flaviviridae), Changuinola (CGV) (familia Reoviridae), punta toro (PTV) (familia Phenuiviridae) y estomatitis vesicular (VSV) (familia Rhabdoviridae). En este estudio se demostró la susceptibilidad de Lulo a la infección por tres de los cinco arbovirus evaluados, MAYV, CGV y VSV, por el contrario, la línea fue refractaria a la infección por ILHV y PTV. Otro aporte importante en este estudio es que ninguno de los virus produjo efecto citopático (ECP), esto permite la replicación de los virus, ya que las células sobreviven por periodos más largos; por otra parte, en los ensayos de interacción de Lulo con promastigotes de *Leishmania chagasi*, se observó que el parásito es capaz de sobrevivir y multiplicarse en las células Lulo, lo cual podría estar relacionado con los factores de crecimiento (Hierro) presentes en el cultivo que son sustancias fundamentales para

la conservación del parásito [51]. Estos resultados son fundamentales para futuros estudios de interacción vector-parásito en el desarrollo de estas células con el objetivo de conocer el ciclo de desarrollo *in vitro*, a pesar de que este parásito es extracelular en el insecto.

Otro estudio relacionado con *L. chagasi* en células Lulo, se realizó mediante la infección de células Lulo y J774 (ratones) con promastigotes de *L. chagasi* durante 10 dpi, en los cuales se calculó el índice de infección, evidenciando un aumento gradual desde el día 2 en ambas líneas celulares; hasta el día 4 y 6 pi donde alcanzaron su pico máximo en las células J774 y Lulo respectivamente. Razón por la cual, las células Lulo podrían considerarse como un modelo alternativo para el estudio del ciclo biológico y la replicación intracelular debido al índice de reproducción del parásito [111]. Este tipo de estudios son importantes a nivel nacional, ya que en Colombia la leishmaniasis visceral es endémica [112]. Otro resultado importante durante este estudio fue la fuerte adhesión que presentaron los promastigotes a las células Lulo, esto puede deberse a los mecanismos de adhesión provocados por moléculas similares a las integrinas, entre el parásito y las células. Esta fuerte interacción entre el parásito y las células de Lulo, es equivalente a la que ocurre en el tracto digestivo del insecto y podría conducir a la adquisición de moléculas del insecto que actúan como opsoninas, lo cual a su vez está relacionado con los índices de replicación de este parásito en la línea celular Lulo [113]. Por otra parte, debido a la importancia de este parásito en Colombia y a la susceptibilidad de las células Lulo, se han realizado estudios constantes para establecer las condiciones ideales de replicación de *L. chagasi*. En el 2008 Miranda y colaboradores [114], infectaron células Lulo con la cepa CL044B/84 de *L. chagasi*, y las sometieron a diferentes variables ambientales y fisicoquímicas, dentro de las cuales se encuentran: el porcentaje de SFB, presencia o ausencia de hemolinfa, pH, osmolalidad y temperatura de incubación de las células infectadas; cada condición se evaluó a los días 3, 6 y 9 pi, encontrando los siguientes valores como los óptimos para alcanzar niveles relativamente altos de infección en los 3 días evaluados: SFB al 5%, con pH a 6.8, osmolalidad de 320 mOsm/Kg e incubados a 28°C; esto es impor-

tante para futuros estudios donde se deseen obtener altas tasas de replicación del parásito [115]. Con esta misma línea celular se han realizado estudios de interacción de diversas especies de parásitos del género *Leishmania* con las células Lulo [116, 117].

Otra línea celular empleada para el estudio de patógenos es *Ae aegypti*, la cual fue infectada con el parásito *Leishmania panamensis* cepa MHOM/CO/87CL412. Los cultivos celulares fueron estudiados mediante Microscopía de Luz de Alta Resolución (HRLM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Donde observaron pequeñas células de apariencia fibroblástica y células epiteliales con núcleo periférico, citoplasma voluminoso y vacuolado, en cuanto a la infección el porcentaje más alto fue (18.90%) de un total de 101 células en el día 6. Algunas células analizadas por TEM presentaron un citoplasma de aspecto vacuolado y algunas contenían parásitos, material fibrilar y otros estaban vacíos. Los resultados indican que las células de *Ae. aegypti* son susceptibles a la internalización, transformación y mantenimiento del parásito *L. panamensis* durante aproximadamente una semana [113].

Los dípteros vectores de enfermedades juegan un papel importante en el tratamiento de las enfermedades que transmiten, por esto se desarrollan líneas celulares de insectos vectores con el fin de conocer cómo se replica el virus; un ejemplo de esto, es la línea celular establecida a partir de tejido embrionario de *Ae aegypti*, en el 2005 la cual presentó mayoritariamente células epiteloides [25]. Esta línea celular se empleó en el 2007 para realizar ensayos de susceptibilidad a infecciones por arbovirus como el DENV (MOI 1 y 5) y el virus de fiebre amarilla (MOI 0,02); en los resultados obtenidos no se observó inmunoreactividad, ni antígeno, ni RNA viral por RT-PCR a partir de células infectadas para ninguno de los MOIs estudiados. Lo que sugiere que la línea celular de *Ae. aegypti* no es susceptible a la infección por ninguno de los virus estudiados [69], infiriendo que las líneas celulares establecidas a partir de la misma especie no se comportan necesariamente igual en cuanto a su susceptibilidad.

Por otra parte, en Colombia se han venido estableciendo líneas celulares a partir de tejido embrionario de especies de la familia Calliphoridae como *Lucilia*

*sericata*, *Sarconesiopsis magellanica* y *Calliphora vicina*, especies de interés médico y forense; en las cuales se ha descrito la morfología celular de los cultivos, la caracterización citogenética y molecular, el medio de cultivo ideal para el crecimiento, etc. Sin embargo, estas líneas no han sido expuestas a la infección por arbovirus ni por protozoos [55, 118, 117, 19, 57]. Por el contrario, se han empleado para el estudio de AMPs de insectos, un ejemplo es la línea celular de *Calliphora vicina*, en la cual se estudiaron AMPs presentes en el tejido graso y la hemolinfa, donde se destacó la importancia de péptidos como defensina, dipterocinas, cecropina y péptidos ricos en prolina; los cuales tienen propiedades antibacteriales (bacterias Gran positivas y Gran negativas) y antifúngicas [110]. Adicionalmente, se han realizado estudios anticancerígenos en células neoplásicas de humanos, en las cuales los AMPs de insectos disminuyeron la replicación celular; no obstante, estos últimos estudios no se han realizado en Colombia, pero representan nuevos enfoques para estudios posteriores [109].

## 7 Conclusiones

Existen múltiples líneas celulares que, si bien han sido caracterizadas morfológica, citogenética y molecularmente, aún no se han estudiado completamente sus aplicaciones en el aislamiento e identificación de virus, en la producción de proteínas recombinantes, pesticidas e insecticidas, vacunas, entre otros; Razón por la cual constituyen una línea de investigación de gran interés para futuros estudios.

En Colombia, se han registrado aportes importantes de cultivos celulares de insectos desde el siglo XX, estableciendo y caracterizando múltiples líneas celulares obtenidas de diferentes especies de dípteros y de diferentes tejidos como huevos, larvas y pupas; en las cuales se han realizado estudios relacionados con la susceptibilidad a infecciones con arbovirus y parásitos. Sin embargo, estudios recientes señalan la importancia de establecer diferentes líneas celulares de la misma especie empleando distintas etapas de desarrollo, ya que se ha demostrado que los cultivos celulares de una especie, presentan diferentes características que le permiten a las células ser más susceptibles a infecciones por parásitos o virus. Fi-

nalmente, el amplio número de estudios donde se emplean cultivos celulares de insectos destaca la importancia de crear un banco de células; donde los investigadores puedan acceder a las diferentes líneas celulares para realizar estudios

## Financiación

Este trabajo hace parte de un macroproyecto cofinanciado por Minciencias (código 124380864546, FP 80740-152-2019), Universidad de La Salle, Universidad Antonio Nariño, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas y la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC).

## Referencias

- [1] M. Marzocca, “Caracterización de antígenos recombinantes de la glicoproteína E2 del virus de la diarrea viral bovina y su utilización como vacunas y reactivos de diagnóstico”, tesis de maestría, Biblioteca central LELOIR, 2013.
- [2] H. Eagle, “Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures”. *Science*, vol. 130, pp. 432-437, 1959. [10.1126/ciencia.130.3373.432](https://doi.org/10.1126/ciencia.130.3373.432)
- [3] A. Igarashi, “Mosquito cell culture and study of arthropod-borne togaviruses”, *Science Direct*, vol. 30, pp. 21-42, 1985. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60447-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60447-9)
- [4] J. Local, “Mecanismo de activación celular en células normales y transformadas por oncogenes”, *Seminario Medico*, vol. 47, pp. 55-66, 1995. <https://dialnet.unirioja.es>
- [5] M. Verkerk, J. Tramper, J. Van, D. Martens, “*Insect cells for human food. Biotechnol*”, vol. 25, pp. 198-202, 2007. [10.1016/j.biotechadv.2006.11.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.004)
- [6] G. Smagghe, C. Goodman, D. Stanley, “*Insect cell culture and applications to research and pest management*” *Springer*, vol. 45, pp. 93-105, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9181-x>
- [7] Z. Braude, V. Kakpakov, N. Schuppe, “Male diploid embryonic cell line of *Drosophila*

- virilis”. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 22, pp. 481-484, 1986. <http://www.jstor.org/stable/4295952>.
- [8] K. Reddy, R. Yedery, C. Aranha, “Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*”, *ELSEVIER*, vol. 24, pp. 536-547, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- [9] A. Zapata, E. Cárdenas, F. Bello, “Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spincrassa* (Diptera: Psychodidae) and their susceptibility to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*”, *Med. Sci. Monit*, vol. 11, pp. 457-464, 2005. PMID: 16319783
- [10] S. Jacobs, L. Wang, A. Rosales, R. Berwaer, E. Vanderlinden, A. Failloux, L. Naesen, L. Delang, “Favipiravir Does Not Inhibit Chikungunya Virus Replication in Mosquito Cells and *Aedes aegypti* Mosquitoes”, *Microorganisms*, vol. 9, p. 944, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050944>
- [11] G. Charpentier, S. Belloncik, G. Ducros, D. Fontenille, L. Tian, J. Quiot, “Establishment and Characterization of Three Cell Lines from *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae)”, *J Med Entomol*, vol. 32, pp. 793-800, 1995. [10.1093/jmedent/32.6.793](https://doi.org/10.1093/jmedent/32.6.793).
- [12] T. Grace, (1966). “Establecimiento de una línea de células de mosquito (*Aedes aegypti* L.) cultivadas in vitro” *Nature*, vol. 211, pp. 366-367, 1966. [10.1038 / 211366a0](https://doi.org/10.1038/211366a0).
- [13] F. Bello, “Cultivos celulares de insectos: antecedentes, características, aplicaciones y aportes realizados en Colombia”, *Memorias 40 ° Congreso Socolen*, pp. 354-362, 2013.
- [14] N. Beltrán & C. González, “Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos”, 2016. ISBN 978-607-28-0688-7.
- [15] R. Nardona, “Erradicación de líneas celulares con contaminación cruzada: un llamado a la acción. *Biología celular y toxicología*”, vol. 23, pp. 367-372, 2007. [10.1007/s10565-007-9019-9](https://doi.org/10.1007/s10565-007-9019-9).
- [16] J. Maurer, “Detección rápida y limitaciones de las técnicas moleculares”, *Revista anual de ciencia y tecnología de los alimentos*, vol. 2, pp. 259-279, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100730>
- [17] C. Segeritz & L. Vallier, “Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro”, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, pp. 151-172, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- [18] N. Segura, E. Santamaría, O. Cabrera, F. Bello, “Establecimiento y caracterización de una nueva línea celular derivada de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)”, *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 107, pp. 89-95, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000100013>
- [19] M. Cruz & F. Bello “Características de cultivos celulares primarios derivados de *Sarconeiosis Magellanica* (Le Guillou, 1842) (Diptera: Calliphoridae)”, *Revista Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 15, pp. 313-321, 2012. ISSN 0123-4226.
- [20] A. Olaya2017 “Introducción a los Cultivo celular para bioquímicos: tipos, medios y manipulación” Ed, Académica Española. pp. 110-125, 2017.
- [21] W. Mckeehan, D. Barnes, L. Reid, E. Stanbridge, H. Murakami, G. Sato, “Frontiers in Mammalian Cell Culture”, *Dev. Biol*, vol. 26, pp. 9-23, 1990. <https://www.jstor.org/stable/4296384>
- [22] M. Tyrkus, C. Diglio, N. Gohle, “*Karyotype evolution in a transformed rat cerebral endothelial cell line. International Journal of Cancer*”, vol. 32, pp. 485-490, 1983. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910320416>
- [23] Culture of animal cells a manual of basic technique, Ed. WILEY Blackwell (USA). R FRESHNEY R. 1987.
- [24] W. Rowley, D. Dorsey, M. Knowles, “The replication of two California serogroup viruses

- in a cell line from the mosquito *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae)”, *Journal of Medical Entomology*, vol. 21, pp. 501-5, 1984. 10.1093/jmedent/21.5.501.
- [25] A. Ardila, J. Escobar, F. Bello, “Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)” *Biomédicas*, vol. 25, pp. 65-75, 2005. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i1.1328>
- [26] A. Herráez, “Biología molecular e ingeniería genética”, ELSEVIER, ed. Fotoletra S.A, 2012.
- [27] I. Schkeider, “Establishment of three diploid cell lines of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae)”, *Journal of Cell Biology*, vol. 42, pp. 603- 606, 1969. 10.1083/jcb.42.2.603.
- [28] C. Cadart, S. Monnier, J. Grilli, R. Attia, B. Terriac, L. Consentino, M. Piel, “Size control in mammalian cells involves modulation of both growth rate and cell cycle duration”, *Nature Publishing Group*, vol. 9, pp. 1-15, 2018. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05393-0>
- [29] P. Echave, I. Conlon, A. Lloyd, “*Cell size regulation in mammalian cells*”, vol. 6, pp. 218-224, 2007. <https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3744>
- [30] M. Pudney & M. Varma, “*Anopheles stephensi* var. *mysorensis*: Establishment of a Larval Cell Line (Mos. 43)”, *Department of Entomology, London School of Hygiene and Tropical Medicine*, vol. 29, pp. 7-12, 1971.
- [31] S. Athawale, A. Sudeep, P. Barde, R. Jadi R, T. Pant, A. Mishra, D. Mourya, “A new cell line from the embryonic tissues of *Culex tritaeniorhynchus* and its susceptibility to certain flaviviruses” Europe PMC, 2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12693860/>
- [32] R. Kuwata, K. Hoshino, H. Isawa, Y. Tsuda, S. Tajima, T. Sasaki, T. Takasaki, M. Kobayashi, K. Sawabe, “Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae)”. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, vol. 48, pp. 369-376, 2012. 10.1007/s11626-012-9520-1.
- [33] Y. Gallo, L. Toro, H. Jaramillo, P. Gutiérrez, M. Marín, “Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia)”, *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 12, pp. 281-292, 2018. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7692>
- [34] M. Segretín, “Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales”, Argen Bio, 2003.
- [35] C. Montalván, A. Ortega, I. González, S. Mondaca, A. Meneses, “Animal cell culture in pharmaceutical biotechnology: research and perspectives”, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 40, pp. 35-46, 2009. ISSN: 1870-0195.
- [36] M. Palmero, “Cultivos celulares. Avances en Cultivos Celulares”, 2011.
- [37] ] M. Drews, T. Paalme, R. Vilu, “The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture”, *Revista de biotecnología*, vol. 40, pp. 187-198, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00045-R](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00045-R)
- [38] N. Rubio, K. Fish, B Trimmer, D. Kaplan, “In Vitro Insect Muscle for Tissue Engineering Applications”, *ACS Ciencia e Ingeniería de Biomateriales*, vol. 5, pp. 1071-1082, 2019. 10.1021/acsbmaterials.8b01261
- [39] K. Singh, “Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.)”, *Current Science*, vol. 36, pp. 506-508, 1967. <https://www.jstor.org/estable/24062647>
- [40] G. Kuno & A. Oliver, Maintaining mosquito cell lines at high temperatures: effects on the

- replication of flaviviruses, *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, vol. 25, pp. 193-6, 1989. 10.1007/BF02626177.
- [41] B. Cahoon, J. Hardy, W. Reeves, "Initiation and characterization of a diploid cell line from larval tissues of *Aedes dorsalis* (Meigen)", *In Vitro*, vol. 14, pp. 255-260, 1978. <https://doi.org/10.1007/BF02616034>
- [42] M. Varma, M. Pudney, C. Leake, "Cell lines from larvae of *Aedes* (*Stegomyia*) *malayensis* Colless and *Aedes pseudoscutellaris* (Theobald) and their infection with some arbovirogenesis", *Trans R. Soc Trop. Med. Hyg.*, vol. 68, pp. 374-382, 1974. 10.1016/0035-9203(74)90152-7.
- [43] D. Morier, S. López, I. Dámasa, M. Álvarez, L. Caballero, L. Mendoza, "Obtención de la sublínea celular CLA-HT. Estudio de su sensibilidad para el aislamiento y multiplicación de los virus del dengue", *Revista Cubana de Medicina Tropical*, vol. 66, pp. 424-432, 2014. ISSN 0375-0760.
- [44] F. Bello, J. Boshell, G. Rey, A. Morales, V. Olano, "Initiation of primary cell cultures from embryos of the mosquitoes *Anopheles albimanus* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae)", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 90, pp. 547-551, 1995. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000400024>
- [45] U. Pant, D. Mourya, A. Sudeep, K. Banerjee, V. Dhanda, "Nueva línea celular embrionaria from *Aedes krombeini* (H.) (diptera: Culicidae)", *Biología In Vitro Celular y del Desarrollo - Animal*, vol. 28, pp. 567-568, 1992. 10.1007/BF02631022.
- [46] M. Oelofsen, A. Gericke, M. Smith, Van Der Linde, "Establishment and Characterization of a Cell Line from the Mosquito *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) and Its Susceptibility to Infection with Arboviruses", *J. Med. Entomol.*, vol. 27, pp. 939-944, 1990. ISSN: 0022-2585.
- [47] S. Hsu, W. Mao, J. Cross, "Establishment of a line of cells derived from ovarian tissue of *Culex quinquefasciatus*", *J. Med. Ent.*, vol. 7, pp. 703-707, 1970. <https://doi.org/10.1093/jmedent/7.6.703>
- [48] F. Bello, H. Brochero, J. Boshell, V. Olano, G. Rey, "Establishment and characterization of a cell line from mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)", *Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 92, pp. 123-128, 1997. 10.1590/s0074-02761997000100027.
- [49] Z. Marhouf & M. Pudney, "A Mosquito Cell Line (Mos. 55) From *Anopheles Gambiae* La(72)90068-5.
- [50] R. Tesh & G. Modi, "Development of a continuous cell line from the sand-fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses", *J Med Entomol*, vol. 20, pp. 199-202, 1983. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.2.199>
- [51] G. Rey, C. Ferro, F. Bello, "Establishment and Characterization of a New Continuous Cell Line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its Susceptibility to Infections with Arboviruses and *Leishmania chagasi*", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 95, pp. 103-110, 2000. 10.1590/s0074-02762000000100017.
- [52] A. Zapata, E. Cárdenas, F. Bello, "Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) and their susceptibility to infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*", *Med. Sci. Monit*, vol. 11, pp. 457-464, 2005. PMID: 16319783.
- [53] F. Bello, M. Jimenez, C. Ferro, "Primary cell cultures of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) and preliminar study karyotypes of the species", *Biomédica*, vol. 17, pp. 49-55, 1997. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v17i1.925>
- [54] F. Bello, J. Rodríguez, J. Escovar, V. Olano, A. Morales, M. González, "A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora conformis* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infections with arboviruses", *Mem Inst*

- Oswaldo Cruz*, vol. 96, pp. 865-873, 2001. 10.1590/s0074-02761997000100027
- [55] L. Echeverry, A. Zapata, N. Segura, F. Bello, “Estudio de cultivos celulares primarios derivados de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae)”, *Rev. Ciencia. Salud*, vol. 7, pp. 17-28, 2009. ISSN 2145-4507.
- [56] Takahashi, Masakazu, Mitsuhashi, Ohtaki, Tetsuya, “Establishment of a cell line from embryonic tissues of the fleshfly, *Sarcophaga peregrina* (Insecta: Diptera)”, *Development, Growth & Differentiation*, vol. 22, pp. 11-19, 1980. 10.1111/j.1440-169X.1980.00011.x.
- [57] I Pinillos, “Establecimiento y caracterización de una línea celular derivada de tejidos embrionarios de la mosca *Calliphora vicina* Diptera: Calliphoridae”, Tesis maestría, Universidad de la Salle, 2020. [https://ciencia.lasalle.edu.co/maest\\_ciencias\\_veterinarias/84](https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/84)
- [58] L. Zheng, J. Li, Q. Yu, B. Zhang, X. Ding, H. Li, H. Zhou, F. Wan, C. Li, “Establishment and characterization of the *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) embryonic cell line QAU-Bd-E-2”, *Developmental Biology*, vol. 57, pp. 735-741, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00619-w>
- [59] L. Bell, M. Fauziah, M. Baptiste, L. Luu, E. Denison, S. Carpintero, A. Houssam, P. Mertens, “Líneas celulares continuas del mosquito mordedor europeo *Culicoides nubeculosus* (Meigen, 1830)”, *Microorganismos*, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganismos8060825>
- [60] A. Harrison, I. Rae, “General techniques of cell culture”, *Handbooks in Practical Animal Cell Biology*, vol. p. 523, 1997.
- [61] *Animal Cell Culture A Practical Approach*, Third edition. J MASTERS, 2001.
- [62] STRYER L. 2015. *Bioquímica*. Reverté.
- [63] E. Acosta, v. Castilla, E. Damonte, “Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells”, *Virus Res*, vol. 160, pp. 173-179, 2011. 10.1016/j.virusres.2011.06.008.
- [64] E. Acosta, V. Castilla, E. Damonte, “Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis”, *The Journal of General Virology*, vol. 89, pp. 474-484, 2008. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83357-0>
- [65] A. Juárez, T. Vega, M Salas, M. García, M. De Nova, R. Ángel, B. Salas, “Detection and sequencing of defective viral genomes in C6/36 cells persistently infected with dengue virus 2” *Archives of Virology*, vol. 158, pp. 583-599, 2012. 10.1007/s00705-012-1525-2.
- [66] G. Pialoux, B. Gauzere, S. Jaureguiberry, M. Strobel, “Chikungunya an epidemic arboviro-sis”, *Las enfermedades infecciosas de Lancet*, vol. 5, pp. 319-327, 2007. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
- [67] Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” Ministerio de Salud Pública [online] “Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del Dengue”, Laboratorio de arbovirus departamento de virología centro colaborador de la OPS/OMS para el estudio del dengue y su vector, La Habana-Cuba 2009, [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Protocolos\\_Dengue\\_IPK\\_2009\\_I.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Protocolos_Dengue_IPK_2009_I.pdf)
- [68] N. Segura & f. Bello, “Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever, and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines”, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, vol. 52, 2018. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0511-2018>
- [69] N. Castañeda, J. Castellanos, A. Zapata, F. Bello, “Línea celular de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) AEGY-28 refractaria a la infección con los virus dengue 2 y fiebre amarilla”, *Acta biológica*, vol. 12, pp. 47-58, 2007. <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=>

sci\_arttext&pid=S0120548X200700020004&lng=en&nrm=iso

- [70] M. Contreras & S. Uribe, (2014). “Lista actualizada de flebotómicos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) de la región cafetera colombiana”, *Biomédica*, vol. 34, pp. 483-498, 2014. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.2121>
- [71] M. Gendrin, & G. Christophides, “The Anopheles Mosquito Microbiota and their impact on pathogen transmission, Anopheles mosquitoes new insights into malaria vectors” 2013. [10.5772/55107](https://doi.org/10.5772/55107).
- [72] B. Longdon, M. Brockhurst, C. Russell, J. Welch, F. Jiggins “The Evolution and Genetics of Virus Host Shifts”, *PLoS Pathogens*, vol. 10, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395>
- [73] V. Stollar, & V. Thomas, “Un agente en la línea celular de *Aedes aegypti* (Peleg) que causa la fusión de las células de *Aedes albopictus*”, *Virology*, vol. 64, pp. 367-377, 1975. [10.1016/0042-6822\(75\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90113-0).
- [74] G. Zhang, S. Asad, A. Khromykh, S. Asgari, “Cell fusing agent virus and dengue virus mutually interact in *Aedes aegypti* cell lines”, *Sci. Rep*, vol. 7, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07279-5>
- [75] A. Baidaliuk, E. Miot, S. Lequime, I. Moltini-Conclois, F. Delaigue, S. Dabo, L. Dickson, F. Aubry, S. Merklings, V. Cao-Lormeau, L. Lambrechts, “Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in *Aedes aegypti* Mosquitoes In Vivo”, *J. Virol*, vol. 93, 2019. [10.1128/JVI.00705-19](https://doi.org/10.1128/JVI.00705-19).
- [76] M. Crabtree, R. Sang, V. Stollar, L. Dunster, B. Miller, “Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus”, *Springer, Arch Virol*, vol. 148, no. 6, pp. 1095-1118, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0019-7>
- [77] M. Crabtree, P. Nga, B. Miller, “Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus”, *Quang Binh virus*, vol. 154, pp. 857-860, 2009. [10.1007/s00705-009-0373-1](https://doi.org/10.1007/s00705-009-0373-1).
- [78] S. Cook, G. Moureau, E. Harbach, L. Mukwaya, K. Goodger, F. Ssenfuka, E. Gould, E. Holmes, X. Lamballerie, “Aislamiento de una nueva especie de flavivirus y una nueva cepa de *Culex flavivirus* (Flaviviridae) de una población natural de mosquitos en Uganda”, *J Gen Virol*, pp. 2669-2678, 2009. [10.1099/vir.0.014183-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.014183-0).
- [79] Bolling B; Eisen L; Moore C; Blair C. (2011). Flavivirus específicos de insectos de los mosquitos *Culex* en Colorado con evidencia de transmisión vertical. *Am J Trop Med Hyg.*, vol. 85, no. 1, pp. 169-177. [10.4269/ajtmh.2011.10-0474](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0474).
- [80] S. Tyler, B. Bolling, C. Blair, A. Brault, K. Pabbaraju, M. Armijos, D. Clark, C. Calisher, M. Drebot, “Distribution and phylogenetic comparisons of a novel mosquito flavivirus sequence present in *Culex tarsalis* Mosquitoes from western Canada with viruses isolated in California and Colorado”, *Am J Trop Med Hyg*, vol. 85, pp. 162-168, 2011. [10.4269/ajtmh.2011.10-0469](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0469).
- [81] L. Peng, B. Guowu, X. Pan, X. Zhiyong, “Wolbachia induces density-dependent inhibition of dengue virus in mosquito cells”, *PLOS ONE*, vol. 6, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754>
- [82] L. Chouin, T. Ant, C. Herd, F. Louis, A. Failloux, S. Sinkins S, “Wolbachia Strain wAlbA bloquea la transmisión del virus Zika en *Aedes Aegypti*”, *Medicina Veterinaria Entomol*, vol. 34, pp. 116-119, 2020. [10.1111/mve.12384](https://doi.org/10.1111/mve.12384).
- [83] L. Moreira, I. Iturbe, J. Jeffery, G. Lu, A. Pyke, L. Hedges, C. Bruno, H. Sonja A. Day, M. Riegler, L. Hugo, K. Johnson, B. Kay, E. McGraw, A. Hurk, P. Ryan, S. O’Neill, “Un simbiote de Wolbachia en *Aedes Aegypti* limita la infección por dengue”, *Chikungunya y plasmodio*, vol. 139, pp. 1268-1278, 2009. [10.1016/j.cell.2009.11.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042).

- [84] V. Geoghegan, K. Stainton, S. Rainey, T. Hormiga, A. Dowle, T. Larson, S. Hester, F. Carlos, B. Tomas, S. Sinkins, "Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* cells", vol. 8, p. 526, 2017. 10.1038/s41467-017-00610-8.
- [85] S. Asad, M. Hussain, L. Hugo, S. Osei-Amo, G. Zhang, D. Watterson, S. Asgari, "Suppression of the pelo protein by *Wolbachia* and its effect on dengue virus in *Aedes aegypti*" *Tropica desatendida de PloS*, vol. 12, p. 4, 2018. 10.1371/journal.pntd.0006405.
- [86] J. Fraser, T. O'donnell, J. Duyvestyn, S. O'neill, C. Simmons, H. Flores, "Novel phenotype of *Wolbachia* strain wPip in *Aedes aegypti* challenges assumptions on mechanisms of *Wolbachia*-mediated dengue virus inhibition", *Patog de PloS*, vol. 16, 2020. 10.1371/journal.ppat.1008410.
- [87] C. Koh, M. Islam, Y. Ye, N. Chotiwan, B. Graham, J. Belisle, A. Konstantinos, S. Dayalan, D. Tull, S. Klatt, R. Perera, E. McGraw, "Dengue virus dominates lipid metabolism modulations in *Wolbachia*-coinfecting *Aedes aegypti*", *Biology communications*, vol. 3, pp. 1-14, 2020. 10.1038/s42003-020-01254-z.
- [88] G. Manokaran, H. Flores, C. Dickson, V. Narayana, K. Kanojia, S. Dayalan S; D. Tull, J. Malcolm, J. Mackenzie, C. Simmons, "Modulation of acyl-carnitines, the broad mechanism behind *Wolbachia*-mediated inhibition of medically important flaviviruses in *Aedes aegypti*", *PNAS*, vol. 117, pp. 24475-24483, 2020. 10.1073/pnas.1914814117.
- [89] G. Haqshenas, G. Terradas, P. Paradkar, J. Duchemin, E. McGraw, C. Doerig, "A Role for the Insulin Receptor in the Suppression of Dengue Virus and Zika Virus in *Wolbachia*-Infected Mosquito Cells", *Cell Rep*, vol. 26, pp. 529-535, 2019. 10.1016/j.cellrep.2018.12.068.
- [90] S. Ford, I. Albert, S. Allen, S. Chenoweth, M. Jones, C. Koh, A. Sebastian, L. Singe, E. McGraw, "Artificial Selection Finds New Hypotheses for the Mechanism of *Wolbachia*-Mediated Dengue Blocking in Mosquitoes", *Microbiol*, vol. 11, p. 1456. 10.3389/fmicb.2020.01456.
- [91] P. Lu, Q. Sun, P. Fu, K. Li, X. Liang, Z. Xi, "Wolbachia Inhibits Binding of Dengue and Zika Viruses to Mosquito Cells", *Frontiers Microbiol*, vol. 11, pp. 1750, 2020. 10.3389/fmicb.2020.01750.
- [92] World Mosquito Program (WMP), "Avances a Nivel Mundial", 2022. <https://www.worldmosquitoprogram.org/es/avances-nivel-mundial/colombia>
- [93] M. Nawa, "Effects of bafilomycin A1 on Japanese encephalitis virus in C6/36 mosquito cells", *Archives of Virology*, vol. 143, pp. 1555-1568, 1998. Disponible en: 10.1007/s007050050398.
- [94] K. Bullard, J. Govero, Z. Zhu, V. Salazar, M. Veselinovic, M. Diamond, B. Geiss, "The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection" *Antivir*, vol. 137, pp. 134-140, 2018. 10.1016/j.antiviral.2016.11.023.
- [95] H. Xu, S. Colby-Germinario, S. Hassounah, C. Fogarty, N. Osman, N. Palanisamy, Y. Han, M. Oliveira, Y. Quan, M. Wainberg, "Evaluation of Sofosbuvir (beta-D-20-deoxy-20-alpha-fluoro-20-beta-C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication", *Sci. Rep*, vol. 7, pp. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06612-2>
- [96] C. Freitas, L. Higa, C. Sacramento, A. Ferreira, P. Reis, R. Delvecchio, F. Monteiro, G. Barbosa-Lima, H. Westgarth, Y. Vieira, M. Mattos, N. Rocha, L. Villas, R. Papaleo, M. Bastos, G. Rodríguez, C. Lopes, C. Queiroz, C. Lima, V. Costa, M. Teixeira, F. Boza, P. Bozza, N. Boechat, A. Tanuri, T. Souza, "Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo", *PLoS Negl. Trop*, 2019. 10.1371/journal.pntd.0007072

- [97] C. Gan, S. Lim, C. Chee, R. Yusof, C. Heh, "Sofosbuvir as treatment against dengue Chem", *Biol. Drug. Des.*, vol. 91, pp. 448-455, 2018. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13091>
- [98] A. Ferreira, P. Reis, C. De Freitas, C. Sacramento, LHoelz, M. Bastos, M. Mattos, N. Rocha, I. Quintanilha, C. Pedrosa, L. Quintino, E. Correia, P. Trindade, Y. Rangel, G. Barbosa, H. Castro, N. Boechat, S. Rehen, K. Bruning, F. Boza, P. Bozza, T. Souza "Beyond Members of the Flaviviridae Family, Sofosbuvir Also Inhibits Chikungunya Virus Replication", *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 63, 2019. 10.1128/AAC.01389.
- [99] I. Albuлесcu, M. Van Hoolwerff, L. Wolters, E. Bottaro, C. Nastruzzi, S. Yang, S. Tsay, J. Hwu, E. Snijder M. Van Hemert, "Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms", *Antivir. Res.*, vol. 121, pp. 39-46, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.013>
- [100] I. Albuлесcu, K. Kovacikova, A. Tas, E. Snijder, M. Van Hemert, "Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles", *Antivir. Res.*, vol. 143, pp. 230-236, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.04.016>
- [101] S. Dong & G. Dimopoulos, "Compuestos antivirales para bloquear la transmisión arboviral en mosquitos", *Virus*, vol. 13, pp. 108-111, 2021. 10.3390/v13010108.
- [102] D. Hultmark, H. Steiner, T. Rasmuson, H. Boman, "Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*", *Eur J Biochem*, vol. 106, pp. 7-16, 1980. 10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x.
- [103] M. Meister, B. Lemaitre, J. Hoffmann, "Defensa peptídica antimicrobiana en *Drosophila*", *BioEssays*, vol. 19, pp. 1019-1026, 1997. 10.1002/bies.950191112.
- [104] Yi, Hy, M. Chowdhury, Y. Huang, "Péptidos antimicrobianos de insectos y sus aplicaciones", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 98, pp. 5807-5822, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- [105] K. Matsuyama & S. Natori, "Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*", *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 17117-17121, 1988. PMID: 3182837.
- [106] W. Cho, Y. Fu, C. Chen, C. Ho "Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*" *Insect Biochem Mol Biol*, vol. 26, pp. 395-402, 1996. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00108-5](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00108-5)
- [107] S. Cociancich, A. Ghazi, C. Hetru, J. Hoffmann, L. Letellier, "Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*", *J Biol Chem*, vol. 268, pp. 19239-19245, 1993.
- [108] R. Maget & M. Ptak, "Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes", *Biophys J*, vol. 73, pp. 2527-2533, 1997. 10.1016/S0006-3495(97)78281-X
- [109] S. Mahmoud, L. Khashab, W. Moselhy, A. Zayed, M. Salama, "Actividad anticancerígena in vitro de la hemolinfa larval y el cuerpo graso de la mosca de la carne *Sarcophaga argyrostoma* (Diptera: Sarcophagidae)", *Avances en Entomología*, vol. 8, pp. 93-105, 2020. <https://doi.org/10.4236/ae.2020.82007>
- [110] Y. Yakovlev, P. Nesin, P. Simonenko, A. Gordya, V. Tulin, A. Kruglikova, S. Chernysh, "Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.D. (Diptera: Calliphoridae) larvae", *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, vol. 53, pp. 33-42, 2016. 10.1007/s11626-016-0078-1.

- [111] F. Bello, A. Mejía, M. Corena, M. Ayala, L. Sarmiento, C. Zúñiga, M. Palau, “Experimental infection of *Leishmania* (L) chagasi in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Culicidae)”, *Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 100, pp. 519-525, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000600004>
- [112] J. Sánchez, J. Cañola, J. Molina, N. Bejarano, A. Vélez, I. Vélez, S. Robledo, “Eco-epidemiología de la leishmaniasis visceral en Colombia”, vol. 11, pp. 1943-2019, 2020. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v11n1a03>
- [113] E. Prina, S. Abdi, M. Lebastard, E. Perret, N. Winter, J. Antoine, “Células dendríticas como células huésped para las etapas de promastigote y amastigote de *Leishmania amazonensis*: el papel de las opsoninas en la captación de parásitos y la maduración de células dendríticas”, *J Cell Sci*, vol. 15, pp. 315-325, 2004.
- [114] Miranda A; Sarmiento L; Caldas M; Zapata C; Bello F. (2008). Morfología y citología de cultivos celulares de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y susceptibilidad a *Leishmania panamensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Revista de Biología Tropical*, vol 56, pp. 447-458.
- [115] V. Acero, E. Galeano, M. Ayala, J. Castellanos, F. Bello, “Interacción de *Leishmania* (L) chagasi con la línea celular Lulo en diferentes condiciones ambientales”, *Revista Colombiana de Entomología*, vol. 32, pp. 165-171, 2006.
- [116] L. Côrtes, R. Silva, B. Pereira, C. Guerra, A. Zapata, F. Bello, L. Finkelstein, M. Madeira, C. Real, C. Alves, “Línea celular Lulo derivada de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): un nuevo modelo para analizar *Leishmania* spp. e interacción vectorial. *Parásitos y vectores*”, vol. 4, pp. 1-5, 2011. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-216>
- [117] L. Côrtes, D. Pita-Pereira, P. Farani, B. Pereira, G. Dias, F. Silva, P. Resende, R. Silva, S. Corte, F. Bello, L. Lima, O. Cruz, M. Caldas, C. Alves, (2020). “Información sobre el perfil proteómico y la expresión génica de la línea celular Lulo derivada de *Lutzomyia longipalpis*” *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 115, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200113>
- [118] M. Acuña, B. Cortés, M. Vargas, N. Segura, F. Bello, “Caracterización citogenética de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: calliphoridae), Cepa Bogotá, Colombia”, *Rev. Cienc. Salud*, vol. 9, pp. 111-114, 2011.