



ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

INFECTION BY *LEISHMANIA* SPP. IN THE HAMSTER *MESOCRICETUS AURATUS* USING PROMASTIGOTES CULTURED *IN VITRO*

INFECCIÓN POR *LEISHMANIA* SPP. EN EL HAMSTER *MESOCRICETUS AURATUS*, USANDO PROMASTIGOTES CULTIVADOS *IN VITRO*

Jesús Eduardo Rojas-Jaimes¹ & José Iannacone^{2,3}

¹Laboratorio de Parasitología-Facultad de Ciencias Biológicas –Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

²Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). El Agustino, Lima, Perú.

³Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Santiago de Surco, Lima, Perú. joseiannacone@gmail.com

The Biologist (Lima), 13(2), jul-dec: 367-374.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic chronic degenerative disease of the mountains and jungle of Peru causing a social stigma in people who suffer from the wounds it causes. *In vivo* models make it necessary to study this neglected disease. In the present study immunosuppressed hamsters *Mesocricetus auratus* were infected with promastigotes of *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. peruviana* cultivated *in vitro* in order to observe the progression of the disease in four months. No disease progression was observed in the time stipulated probably by loss of virulence of the *Leishmania* sp. promastigotes used in the challenge. The results show that infection and progression of leishmaniasis requires conditions such as virulence and viability and that this is lost due to the passages *in vitro* cultures.

Keywords: infection, immunosuppression, *Leishmania*, virulence.

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad crónica degenerativa endémica de la sierra y selva del Perú que provoca un estigma social en las personas que la padecen por las heridas que provoca. Los modelos *in vivo* se hacen necesarios para estudiar esta enfermedad desatendida. En el presente estudio se infectaron hámsteres *Mesocricetus auratus* inmunosuprimidos con promastigotes cultivados *in vitro* de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* con el objetivo de observar la progresión de la enfermedad en cuatro meses. No se observó progresión de la enfermedad en el tiempo estipulado probablemente por la pérdida de virulencia de los promastigotes de *Leishmania* que se utilizaron en el ensayo. Los resultados muestran que para la infección y progresión de la Leishmaniasis se requiere de condiciones como la viabilidad de la virulencia y que ésta se pierde por los pasajes en los cultivos *in vitro*.

Palabras clave: infección, inmunosupresión, *Leishmania*, virulencia.

INTRODUCCION

La leishmaniasis es una enfermedad tropical olvidada que está presente en 88 países, causada por protozoarios del género *Leishmania*, que son transmitidos a los mamíferos por artrópodos como *Lutzomyia*, *Phlebotomus* y *Sergentomyia* (Diptera; Psychodidae; Phlebotominae) (Berdjane-Broux *et al.* 2012, Rojas 2012). El parásito tiene un ciclo de vida dimórfico en el cual reside en forma extracelular como promastigotes en el vector, y en forma intracelular como amastigote en los macrófagos de los mamíferos. Existen dos subgéneros dependiendo donde se reproduzca en el insecto vector que son *Leishmania* y *Viannia* (ISU 2010). Esta enfermedad está catalogada como la segunda en mortalidad y la cuarta en morbilidad entre las enfermedades tropicales, con 20000 a 40000 muertes por año (CFSPH 2012).

Los modelos animales sirven para conocer con mayor exactitud la fisiopatología de la leishmaniosis (Oliveira *et al.* 2014), por lo tanto se han desarrollado modelos de infección intradérmica en ratones BALB/c y en hámsteres *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839, en los cuales los parásitos migran de la piel a las vísceras (De Souza *et al.* 2001, McCall *et al.* 2013). Sin embargo, para ambos modelos la dosis de inoculación es de 100 a 1000 veces mayor que en una infección natural, porque estos modelos se emplean para estudiar las rutas de infección en la leishmaniasis visceral para proveer conocimiento sobre el mecanismo celular y las vías de infección hasta alcanzar los órganos internos (McCall *et al.* 2013).

Aunque el modelo murino con ratones BALB/c se usa para el estudio de la leishmaniasis visceral; este modelo no refleja necesariamente la progresión de la leishmaniasis visceral en humanos; en los

ratones, la infección hepática se resuelve por sí misma; mientras que la infección en el bazo es progresiva y muchas veces es asintomática. El modelo murino también se ha usado para evaluar la patogenia de *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914 en animales susceptibles (Laskay *et al.* 1995, McCall *et al.* 2013). En contraste la infección en hámsteres se asocia con una enfermedad sintomática, mostrándose como un buen modelo (Requena *et al.* 2000); así como en el mantenimiento de amastigotes usando pasajes sucesivos entre uno y otro animal (Zivcec *et al.* 2011, Kushawaha *et al.* 2012); siendo las vías de infección en los hámsteres: la sangre contaminada de donadores, la transfusión cardiaca y el fraccionamiento de células mononucleares infectadas (De-Sousa *et al.* 1996, Lei *et al.* 2010).

La dosis parasitémica para la infección en modelos animales varía dependiendo del estudio a realizar. El monitoreo depende del estado clínico que se espera obtener (De-Ayuela *et al.* 2007). Algunos estudios utilizan los amastigotes provenientes de las biopsias de pacientes positivos por microscopía para *Leishmania* y los inyectan directamente en los hámsteres (Sartori *et al.* 1987). Es importante la vía de inoculación y el estadio del parásito. Los promastigotes en ciertas condiciones pueden no ser infectivos (Nieto *et al.* 2011).

Los hámsteres infectados con *L. donovani* comienzan con manifestaciones entre los 3 a 4 meses presentando esplenomegalia, caquexia, y ascitis con una carga parasitémica de 0,1 mL de 10^7 a 2×10^7 (Laskay *et al.* 1995). Otro estudio detectó los parásitos (*Leishmania infantum* - *Leishmania chagasi* Nicolle, 1908), vía la oreja del hámster en la sangre, bazo e hígado a los 15 días después de la infección. El modelo del hámster es muy adecuado para observar las manifestaciones clínicas típicas de este tipo de leishmaniasis, incluida la glomerulonefritis (Sartori *et al.* 1991, Melby *et al.* 2001).

Los modelos usados en el laboratorio muestran que especies como *L. infantum* - *L. chagasi* y *L. donovani* se diseminan mejor a nivel visceral que *L. major*. Estas especies involucradas en la leishmaniasis visceral están mejor adaptadas a sobrevivir y progresar en el medio visceral (Lei *et al.* 2010).

Aún existe un vacío en el uso de animales experimentales que simulen la infección en el humano, además de las condiciones para que las especies con mayor prevalencia en el Perú sean infectivas y causen la clínica de la leishmaniasis en el modelo del Hámster.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la infección por *Leishmania* spp. en el hámster *M. auratus*, usando promastigotes cultivados *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo animal: Hámsteres dorados hembras de *M. auratus* de un mes de nacidos fueron acondicionados en jaulas individuales con ventilación natural y cama de viruta. El acondicionamiento se realizó en el Bioterio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú. Se utilizaron 6 grupos de experimentación: (1) 3 hámsteres como control positivo infectados con *L. infantum*; (2) 3 hámsteres infectados con *L. brazilensis*; (3) 3 hámsteres infectados con *L. guyanensis*; (4) 3 hámsteres infectados con *L. peruviana*; (5) 2 hámsteres sin infección como control negativo y 1 hámster inmunosuprimido con dexametaxona 16 mg·Kg⁻¹ cada dos días por una semana; y (6) 3 hámsteres infectados cada uno con *L. brazilensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* sin inmunosupresión.

Inmunosupresión: Se suministró dexametaxona 16 mg·Kg⁻¹ cada dos días por

una semana. Adicionalmente se administró ciclosporina 15 mg·Kg⁻¹/1 semana, vía oral post infección (Melby *et al.* 2001). Se evaluó la inmunosupresión por el recuento leucocitario por punción cardiaca del animal sacrificado con cloroformo usando 10 ul de sangre y 90 ul de Solución Thurt. Esta solución hemolisa a los eritrocitos y deja a los leucocitos. La comparación se realizó utilizando un animal inmunosuprimido y uno sin supresión previo a la infección.

Viabilidad de Promastigotes: Fue evaluada a través de la toma de una alícuota con un asa de siembra de 10 ul y colocándose bajo la observación del microscopio con un aumento de 400 X para la confirmación de células viables móviles.

Leishmanina: 0,15 mL de promastigotes de las especies *L. infantum*, *L. brazilensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* a una concentración de 2×10^7 crecidos en un medio líquido axénico de Sneider facilitaron la multiplicación y forma infectiva vía intraperitoneal (Duran *et al.* 2010). Se afeitó la zona izquierda del abdomen de los hámsteres, se inyectó 0,1 mL por vía subcutánea de leishmanina 25 ug·mL⁻¹ de *L. peruviana* en la zona abdominal. Se observó a las 24 h y 48 h si existía una reacción en forma de pápula. El procedimiento se repitió en forma similar usando 0,01 mL de leishmanina (Berdjane-Broux *et al.* 2010) y clínica a un mes posterior a la infección.

Observación microscópica del hígado teñido con Giemsa y Eosina-Hematoxilina: a 120 días en una campana saturada de la solución cloroformo, se disectó el animal asépticamente tomando muestras de hígado de los 3 hámsteres con *L. brazilensis*. Las muestras del hígado se tomaron usando un pedazo de bajalenguas estéril y colocándolas en láminas portaobjetos para el procedimiento de teñido por Giemsa para la observación microscópica (Handman 2001). Para el teñido con Giemsa se realizó una dilución con una

gota de Giemsa/1mL de agua destilada dejando la muestra por 30 min. Se lavó con agua de caño para quitar el colorante. Para el teñido con Eosina-Hematoxilina se procedió a cortar para separar el hígado de los tejidos contiguos, luego las áreas cortadas se pasaron por una batería de alcoholes etílicos y finalmente por parafina. Esta sección finalmente se cortó con un micrótopo, seguidamente se tiñó con Eosina-Hematoxilina, se montó en la lámina portaobjetos con un cubreobjetos y se observó al microscopio óptico a 400X de aumento.

Procedimiento del PCR (High Resolution Melting “HRM”): Las muestras hepáticas también se colocaron en tubos eppendorf en alcohol etílico de 96° para las pruebas moleculares por “High Resolution Melting PCR”. Se procedió a extraer el ADN de los tejidos hepáticos de los hámsteres con *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L.*

peruviana. Se amplificó una región del ADN del Kinetoplasto correspondiente al minicirculo de *Leishmania*, utilizando cebadores que muestran las curvas patrones para cada especie evaluada.

RESULTADOS

Se realizó el recuento leucocitario luego de suministrar dexametaxona por una semana obteniendo en el hámster inmunosuprimido: 14800/10 ul de sangre y en el Hámster no inmunosuprimido: 28000/10 ul de sangre. En la prueba de la leishmanina no se observó pápula alguna usando 0,1mL o 0,01 mL de leishmanina. No se logró identificar alguna lesión clínica en los hámsteres a los 120 días. No se logró observar presencia de amastigotes en el frotis realizados con Giemsa (Tabla 1).

Tabla 1. Tinción con Giemsa del tejido hepático en búsqueda de amastigotes.

Especie de Leishmania/Observación	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. peruviana</i>	Control Negativo
Microscópica a 1000X de la Tinción Giemsa					
Presencia de Amastigotes					
No Presencia de Amastigotes	X	X	X	X	X

La coloración hepática con Eosina Hematoxilina vista a 400x de los Hamsteres 1-3 evidencia infección por *L. braziliensis* con cuerpos extraños (flechas rojas), pero no

amastigotes (Figs. 1-3). La Fig. 4 muestra los Resultados de HRM para diferenciación de las cuatro especies de *Leishmania*.

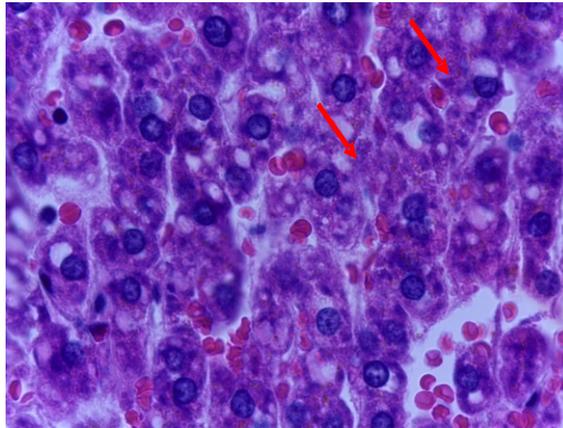


Figura 1. Tinción hepática con Eosina Hematoxilina vista a 400x del Hamster-1 infectado por *L. brazilensis* con la observación de algunos cuerpos extraños (flechas rojas).

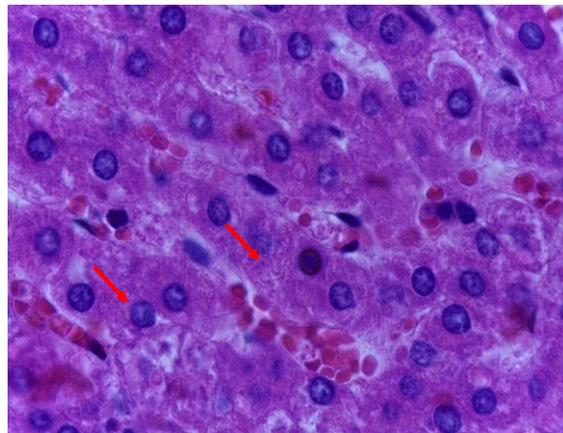


Figura 2. Tinción hepática con Eosina Hematoxilina vista a 400x del Hamster-2 infectado por *L. brazilensis* con la observación de algunos cuerpos extraños (flechas rojas).

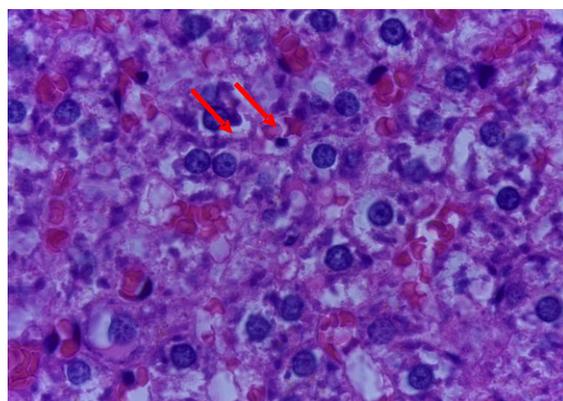


Figura 3. Tinción hepática con Eosina Hematoxilina vista a 400x del Hamster-3 infectado por *L. brazilensis* con observación de algunos cuerpos extraños (flechas rojas).

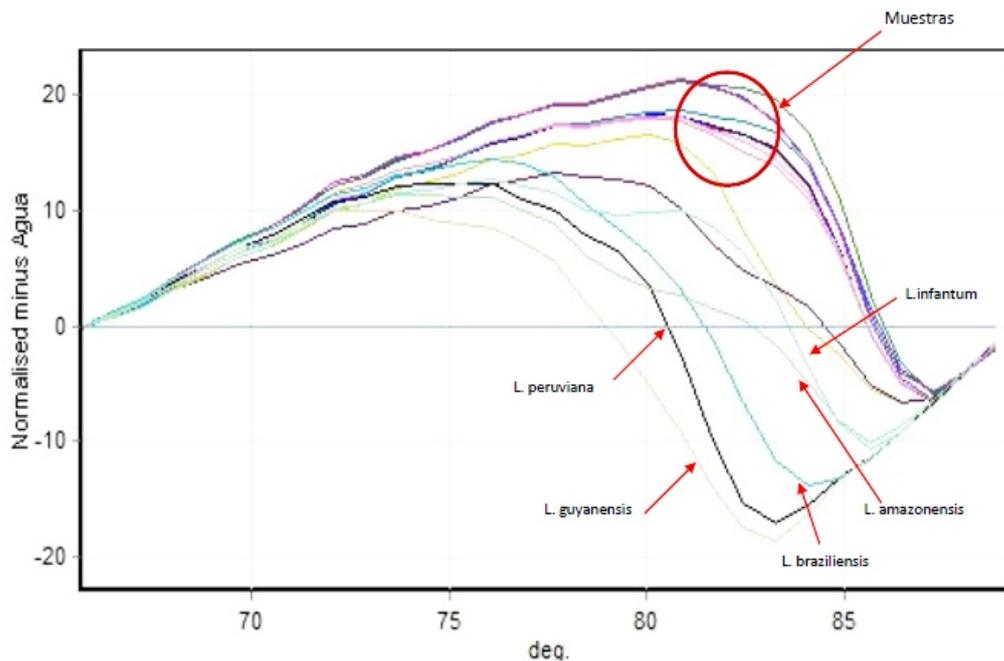


Figura 4. Resultados de HRM para diferenciación de especies de *Leishmania* spp.

DISCUSIÓN

La infección en hámsteres cuando se desarrolla y refleja la enfermedad es similar al ser humano, al presentarse una enfermedad sintomática y que puede llegar a ser fatal. Se recomienda por lo tanto a este animal como un modelo adecuado (Requena *et al.* 2000). Uno de los factores más importantes para que se manifieste la enfermedad en el modelo hámster es el mantenimiento de amastigotes usando pasajes sucesivos de un animal a otro (Zivcec *et al.* 2011, Kushawaha *et al.* 2012). En este estudio se tomó a promastigotes cultivados *in vitro* que probablemente perdieron la virulencia por los pasajes sucesivos en el laboratorio y por lo tanto no fueron observadas manifestaciones clínicas en el tiempo de evaluación, a pesar de que la dosis

de promastigotes fueron las adecuadas según estudios previos, y además los animales fueron inmunosuprimidos sin reacción a la leishmanina (Fig. 1) (Engwerda *et al.* 2004, Dea-Ayuela *et al.* 2007). Se ha mencionado que el estadio del promastigote es el determinante para que se pueda presentar la enfermedad (Jimenez *et al.* 2002). El estadio recomendable para la infección es el promastigote metacíclico, y este se obtiene cultivando el parásito en un medio ligeramente ácido a pH 5,5, o amastigotes obtenidos de biopsias positivas para *Leishmania* (Gamboa *et al.* 2008). La tinción con Giemsa para identificar amastigotes en los tejidos de los animales fue negativa (tabla 1). Además con la tinción con Eoxina-Hematoxilina tampoco se identificó al parásito en el tejido hepático (Figs. 1-3). La fase del promastigote metacíclico puede ser identificada morfológicamente por la forma

del cuerpo del parásito y el rango entre el tamaño del cuerpo y el flagelo (Gamboa *et al.* 2008). En este estudio aunque no se observó la morfología del parásito se esperaba no encontrar el estadio del promastigote metacíclico que es la más virulenta por ser un cultivo *in vitro*. El PCR por “High Resolution Melting” (HRM) tampoco detectó la presencia de ADN de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* en tejido hepático. Sin embargo, se dedujo que existió cuerpos extraños en este tejido infectado por *L. braziliensis* (Fig. 4).

Se concluye que la infección y progresión de la enfermedad de la Leishmaniasis *in vivo* en Hámsteres con promastigotes de *Leishmania* requiere de ciertas condiciones como la inoculación de promastigotes metacíclicos, parásitos aislados de pacientes o de animales de laboratorio donde los factores de virulencia se mantienen.

AGRADECIMIENTO

A todo el personal de AnatoPatología del Hospital Nacional Guillermo Almenara, Lima, Perú por el apoyo brindado en el procesamiento de los tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATL (Análisis y tendencias de la leishmaniasis, en el Perú). 2012. (Hasta la SE. N° 52 2012). Boletín de Epidemiología (Lima), 21: 885–888.
- Berdjane-Broux, Z.; Koné, A.; Djimé, A.A.; Charrel, R.N.; Ravel, C.; Delaunay, P.; del Giudice, P.; Diarra, A.Z.; Doumbo, S.; Goita, S.; Thera, M.A.; Depaquit, J.; Marty, P.; Doumbo, O.K. & Izri, A. 2012. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaomyia) darlingi* from cutaneous Leishmaniasis foci in Mali. PLOS one, 7: 1-5.
- CFSPH (The Center for Food Security & Public Health), Institute for International Cooperation in Animal Biologies an OIE Collaborating Center. Iowa State University. 2015. *Leishmaniasis (cutánea y visceral)*. Leishmaniasis cutánea y visceral. 10:1-13 Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>. leído el 15 de noviembre del 2015.
- De-Sousa P.; De-Sousa, P.; Gomes, E.M.; Soares-Machado, F.C.; Luz, K.G. & Borojevic, R. 1996. Transmission of visceral leishmaniasis by blood transfusion in hamsters. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 29: 1311-1315.
- De Souza, P.; Pereira, E.; Machado, F.C.S.; Melo, M.F.; Souto-Padrón, T.; Palatnik, M. & Palatnik-de-Sousa, C.B. 2001. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. Acta Tropica, 80: 69-75.
- Dea-Ayuela, M.; Rama-Iñiguez, S.; Alunda, J. & Bolás-Fernandez, F. 2007. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for *in vivo* testing of antileishmanial compounds. Veterinary Research Community, 31: 703-717.
- Duran, C.; Rodriguez-Bolivar, D. & Roschman-Gonzalez, A. 2010. Análisis cuantitativo del crecimiento y cambio morfométrico en poblaciones de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 1:39-52.
- Engwerda, C.; Ato, M. & Kaye, P. 2004. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends in Parasitology, 20: 524-530.
- Gamboa, D.; Torres K.; De Doncker, D.;

- Zimic, M.; Arevalo, J. & Dujardin, J. 2008. Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*, 135: 319-326.
- Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 229–243.
- Jiménez, N.; Restrepo, J.; Arango, G. & Puerta, J.A. 2002. Estandarización del método de la “bolsa de aire” para su utilización en la evaluación *in vivo* de sustancias con actividad leishmanicida. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15: 247-252.
- Kushawaha, P.; Gupta, R.; Tripathi, C.; Sundar, S. & Dube, A. 2012. Evaluation of *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase as a potential immunogenic protein/vaccine candidate against visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 7:1-14.
- Laskay, T.; Diefenbach, A.; Röllinghoff, M. & Solbach, W. 1995. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology*, 25: 2220-2227.
- Lei, S.; Ramer –Tai, A.; Dahlin-Laborde, R.; Mullin, K. & Beetham, J.K. 2010. Reduced hamster usage and stress in propagating *Leishmania chagasi* promastigotes using cryopreservation and saphenous vein inoculation. *Journal of Parasitology*, 96:103-108.
- McCall, L.I.; Zhang, W.W. & Matlashewski, G. 2013. Determinants for the development of visceral Leishmaniasis disease. *PLoS pathogens*, 9:1-7. e1003053.
- Melby, P.; Chandrasekar, B. & Zhao, W. 2001. The hamster as a model of human Visceral Leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-Like Cytokine response. *The Journal of Immunology*, 1767:1912-1920.
- Nieto, A.; Domínguez-Bernal, G.; Orden, J.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N. & Carrión, J. 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/cmouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research*, 42:1-13.
- Oliveira, C.; Jania, M.; Gomez, R.; Barral, A. & Brodskyn, C. 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, 1: 81-86.
- Requena, J.; Soto, M.; Doria, M. & Alonso, C. 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76: 269-281.
- Rojas, J. 2012. Leishmaniasis: una enfermedad desatendida. Un acercamiento a la realidad en Huetpetuhe, Madre de Dios. *Revista Peruana de Epidemiología*, 16: 1-4.
- Sartori, A.; De Oliveira, A. & Roque-Barreira, M. 1987. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunology*, 9:93-103.
- Sartori, A.; Roque-Barreira, M.; Coe, J. & Campos-Neto, A. 1991. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar II: Detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. *Clinical Experimental Immunology*, 87: 386-392.
- Zivcec, M.; Saffronetz, D. & Haddock, E.; Feldmann, H. & Ebihara, H. 2011. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal Immunological Methods*, 368: 24-35.

Received June 10, 2015.
Accepted December 27, 2015.