

El hámster como modelo experimental para la inoculación de *Leishmania*

Burna, A.N*.; Sanchez Negrette, M*.; Catuogno, MS; Mirad A*; Maccio OA.**

*Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.

e-mail: patgral@vet.unne.edu.ar

**Prof. Titular del área Diagnóstico complementario del hospital de clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE

Resumen

La leishmaniasis visceral es considerada la forma más severa de las enfermedades causadas por *Leishmania* spp, pudiendo llegar a ser fatal. La implementación del hámster como modelo experimental en nuestro laboratorio, que reproduzca la enfermedad con cierta similitud a lo que ocurre en los caninos, es de gran utilidad para la evaluación experimental de drogas terapéuticas. El objetivo de este trabajo fue reproducir experimentalmente la infestación por *Leishmania* spp en hámster. 10 hámsters fueron inoculados con macerado de medula ósea y bazo de un canino naturalmente infestado. Todos los animales se sacrificaron a los tres meses pos inoculación. Para confirmar si se encontraban infestados se realizaron frotis de bazo y medula ósea como primera medida y se colorearon con giemsa. Luego de realizada la necropsia los órganos fueron inmediatamente fijados en formol bufferado al 10%. Se han observado durante el periodo post inoculación una pérdida progresiva del estado corporal, con pérdida de pelo en algunos casos. Uno de los hámsters presentó una lesión

en la superficie de la nariz. 6 de los 10 animales mostraron hepato-esplenomegalia al momento del examen de la cavidad abdominal. Sin observarse lesiones aparentes en otros órganos. Los frotis de bazo y medula ósea coloreados con giemsa, arrojaron un resultado positivo en el 100 % de los casos. El examen histopatológico del bazo evidenció un infiltrado linfoplasmocitario difuso. En conclusión nuestros resultados confirman la existencia de amastigotes de leishmania por coloración con giemsa en frotis de medula ósea y bazo, que si bien los cortes histopatológicos coloreados con hematoxilina y eosina no evidenciaron amastigotes, las características son compatibles con dicha enfermedad en los hámster infestados experimentalmente por vía intraperitoneal. Los resultados histopatológicos encontrados en estos animales nos permiten usarlos como modelo experimentales con el fin de implementar diferentes alternativas terapéuticas a ser utilizadas posteriormente en caninos.

Palabras clave: Leishmania, hámster, modelo experimental

Summary

Visceral leishmaniasis is considered the most severe form of disease caused by *Leishmania* spp and can be fatal. The implementation of the hamster as an experimental model in our laboratory to reproduce the disease with some similarity to what occurs in dogs, it is useful for the experimental evaluation of therapeutic drugs. The aim of this study was to reproduce experimentally the *Leishmania* infestation in hamsters. 10 hamsters were inoculated with macerated bone marrow and spleen of a naturally infected dog. All animals were sacrificed at three months post inoculation. To confirm whether they were infected smears were taken from spleen and bone marrow as a first step and stained with Giemsa. After completion of the autopsy the organs were immediately fixed in buffered formalin 10%. Have been observed during post

inoculation a progressive loss of body condition, with hair loss in some cases. One of the hamsters had a lesion on the surface of the nose. 6 of the 10 animals showed hepatosplenomegaly on examination of the abdominal cavity. No apparent lesions observed in other organs. Smears of spleen and bone marrow stained with Giemsa, showed a positive result in 100% of cases. Histopathologic examination of the spleen showed a diffuse lymphoplasmacytic infiltrate. In conclusion our results confirm the existence of leishmania amastigotes by Giemsa staining in smears of bone marrow and spleen, although the histopathological sections stained with hematoxylin and eosin showed no amastigotes, the features are compatible with the disease in experimentally infected hamster intraperitoneally. The histopathology results found in these animals allow us to use as experimental model in order to implement different therapeutic alternatives to be used later in canines.

Keywords: Leishmania, hamster experimental model

Introducción

Se conoce por leishmaniasis a la enfermedad causada por protozoos del género *Leishmania*, se encuentra distribuida en diferentes áreas del planeta y corresponde a una infección antroponótica que llega al hombre por la picadura de insectos infectados (1). La manifestación clínica con compromiso de las vísceras es conocida como leishmaniasis visceral (LV) y es producida por el complejo donovani que incluye las especies *L donovani*, *L infantum* y *L. chagasi*. En el Nuevo Mundo la LV es fundamentalmente causada por *L chagasi* y transmitida por el vector *Lutzomyia longipalpis* (2). En los últimos años se ha avanzado en el entendimiento de los mecanismos inmunes que involucran al parásito, pero aún se mantiene como reto el

desarrollo de una terapia efectiva para la curación de los animales afectados. Estudios de la infección en ratones, plantean que este modelo no reproduce las características de la LV activa en humanos una vez que el ratón muestra un rápido aumento de la densidad parasitaria con inducción de una respuesta celular específica capaz de controlar la infección (3). Diferente ha sido la observación en hámster como modelo experimental en el estudio de la LV activa, en los que se conoce hay pérdida de la respuesta inmune celular específica a antígeno de forma similar a como se presenta en humanos y caninos (4). Se ha demostrado que la infección sistémica por *L. donovani* en hámster resulta en un aumento progresivo de la masa parasitaria en hígado y bazo, hepato-esplenomegalia, caquexia, pancitopenia y muerte (5). Estas lesiones encontradas en los hamsters en la fase activa de la enfermedad son citadas por diversos autores y semejan a las encontradas en humanos y caninos.

El objetivo de nuestro trabajo fue implementar este modelo experimental en nuestro laboratorio para poder realizar diferentes tratamientos o alternativas terapéuticas a ser utilizada de manera beneficiosa en el futuro pa el control y posible erradicación de la leishmaniasis en caninos

Materiales y métodos

Se utilizaron para el estudio 10 hamsters de 2 meses de edad, de ambos sexos obtenidos de criadero. Formándose dos grupos de 5 animales cada uno, que fueron inoculados, vía intraperitoneal con macerado de bazo y medula ósea de un canino infestado naturalmente y diagnosticado mediante los métodos serológico y parasitológico directo.

A los Animales se les administro agua y alimento ad-libitum y fueron observados

durante 3 meses post-inoculación para determinar las lesiones y cambios físicos que pudieran presentar. Posteriormente se los sacrificó para su estudio histopatológico en el laboratorio de histopatología de la Cátedra de Patología General y Sistemática de la Universidad Nacional del Nordeste.

Luego de llevado a cabo el sacrificio se realizó la necropsia mediante la técnica convencional de apertura de cavidades y posterior observación de los órganos.

Para confirmar si los animales se encontraban infestados se realizaron frotis de bazo y medula ósea como primera medida para ser coloreados con giemsa, en una dilución de una parte de giemsa en nueve de agua destilada

Luego de realizada la necropsia los órganos fueron inmediatamente fijado en formol bufferado al 10%, durante 48 a 72 horas.

Procesamiento de las muestras Cada uno de los órganos fue procesado siguiendo la técnica clásica de inclusión en parafina, previa deshidratación en alcoholes crecientes y pasaje por xilol, realizándose cortes a 5 micrómetros con microtomo tipo Minot y posteriormente secados en estufa a 35° C por 24 horas y colorados con Hematoxilina y Eosina como técnica de rutina.

Todos los datos obtenidos en el estudio microscópico fueron volcados en fichas individuales.

Resultados

Se observó durante el periodo post-inoculación una pérdida progresiva del estado corporal, con pérdida de pelo en algunos casos, tanto en los animales que fueron inoculados con el macerado de bazo como de medula ósea. Uno de los hámsters presento una lesión de tipo ulcero-costroza en la superficie de la nariz (Figura 1)

Al examen de la cavidad abdominal 6 de los 10 animales presentaron hepatoesplenomegalia como única lesión macroscópica. (Figura 2)

Los frotis de bazo y medula ósea coloreados con giemsa arrojaron un resultado positivo en el 100 % de los casos.

El examen histopatológico evidenció en el bazo un infiltrado linfoplasmocitario, no hallándose estructuras compatibles con amastigotes de leishmania.

En el hígado se observó múltiples focos de infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario localizado principalmente en la zona periportal a nivel de las triadas, así como también degeneración hidrópica y grasa de hepatocitos y áreas de necrosis centrolobulillar.

Los riñones presentaron congestión medular principalmente y pequeños focos de infiltrado inflamatorio linfocitario intersticial.

Los demás órganos no evidenciaron lesiones en el estudio microscópico.



Fig. 1 Hámster con lesión
Ulcer-costroza en la nariz



Fig. 2 Observación de hepatoesplenomegalia

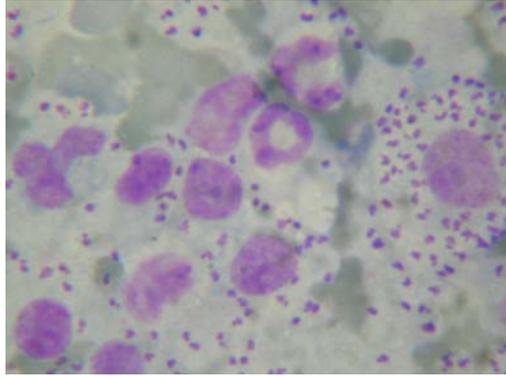


Fig. 3 Estructuras compatibles con amastigotes de leishmania intra y extracelular en bazo . Tinción giemSa 100X

Discusión y conclusión

Diferentes métodos son empleados para el diagnóstico de la Leishmania (6). Sin embargo, el diagnóstico definitivo de la leishmaniasis depende de la caracterización morfológica de amastigotes en tejidos, convencionalmente realizado por tinción con giemsa de frotis o secciones histopatológicas teñidas con hematoxilina-eosina (7). No obstante, la identificación histopatológica resultar difícil y requiere un análisis cuidadoso y prolongado. En nuestra experiencia fue posible diagnosticar la Leishmania por las características morfológica de amastigotes en frotis de bazo y medula ósea coloreados con giemsa, estos fueron observados dentro del citoplasma de macrófagos así como extracelularmente.

Luego de una ardua búsqueda mediante observación de los preparados histológicos coloreados con H y E, no se pudieron evidenciar los parásitos incluso en presencia de lesiones compatibles típicas de la leishmaniasis visceral.

En conclusión nuestros resultados confirman la existencia de amastigotes de leishmania por coloración con giemsa en frotis de medula ósea y bazo, y que si bien los

cortes histopatológicos coloreados con hematoxilina y eosina no evidenciaron la presencia de amastigotes de leishmania, las características de las lesiones son compatibles con dicha enfermedad en los tejidos de hámster infestados experimentalmente por vía intraperitoneal. Permitiendo de esta manera tener un modelo experimental para realizar diferentes tratamientos o alternativas terapéuticas a ser utilizada posteriormente en caninos.

Bibliografía

1. Leishman, W. B. On the possibility of occurrence of tripanosomiasis in India. *Br. Med. J.* 1903, 30 p.1252.
2. Ashford, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J. Parasitol.* 2000, 30 p. 1269-1281.
3. Peter C. Melby, Yan-Zhu Yang, Jun Cheng, and Weiguo Zhao. Regional Differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*, 1998, 66 (1) p. 18-27.
4. Melby, P. C., B. Chandrasekar, W. Zhao, and J. E. Coe. 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 response. *J. Immunol.* 2001, vol. 166 p.1912-1920.
5. Melby, P. C., V. V. Tryon, B. Chandrasekar, and G. L. Freeman. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, 1998, 66 p. 2135-2142.

6. Shyam Sundar and M. Rai. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Minireview. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002, 9 (5) p. 951-958.
7. Stauber, L.A., Franchino, E.M., Grun, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J. Protozool.* 1958, 5 p. 269-273.