

Estandarización del método de la “bolsa de aire” para su utilización en la evaluación *in vivo* de sustancias con actividad leishmanicida

Nora Jiménez¹, QF; Juan G Restrepo¹, DMV, SSc; Gabriel J Arango¹, Q, PhD; Juan A Puerta, Bact².

¹ Profesor Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas
Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia,

²Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) Universidad de Antioquia.
AA 1226. Medellín, COLOMBIA.*
gjarango@quimbaya.udea.edu.co

(Recibido: 26 julio, 2001; aceptado: 10 abril, 2002)

Resumen

La evaluación de sustancias con actividad Leishmanicida in vivo, actualmente se realiza en modelos animales (ratones o hámster), previo aislamiento y cultivo de los parásitos de Leishmania spp. y su posterior inoculación y producción de infección en el animal. En este estudio se adaptó la técnica de «Bolsa de aire» descrita por Edwards y colaboradores en 1981, inoculando promastigotes de Leishmania Viannia panamensis (cepa MHOM/CO/87/UA140) vía subcutánea en el espacio interescapular en hámster dorados (Mesocricetus auratus) machos, con el fin de estandarizar un método adecuado para la evaluación in vivo de la actividad leishmanicida de sustancias de origen natural, sintético o hemisintético. En los días 30, 60 y 90 post-inoculación, a cada reactivo biológico se le realizó frotis y aspirado para cultivo en medio NNN para determinar la presencia de infección; en el día 90 a los animales se les aplico la eutanasia, y se tomaron biopsias del sitio de inoculación. Las muestras se procesaron y colorearon con los métodos de Hematoxilina - Eosina y Giemsa. Los aspectos éticos relacionados con el manejo y cuidado de los hámster contaron con la aprobación del "Comité de Ética de Animales de Experimentación" de la Universidad de Antioquia y del Ministerio de Salud. La "bolsa de aire" se formo en todos los especímenes, encontrándose permeable, revestida por varias hileras de células simulando el revestimiento articular y a su alrededor se encontraron macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares. Sin embargo, no se logro el establecimiento de la infección en los animales en estudio, debido posiblemente a varios factores entre los cuales se puede mencionar la patogenicidad de la cepa del parásito utilizado, la vía y sitio de inoculación y la respuesta inmunológica del Hámster.

Palabras clave: *Bolsa de aire, diestrés, dosis infectiva, Leishmania panamensis, reactivo biológico.*

Introducción

Es de gran preocupación para la comunidad y los servicios de salud, la proliferación de la leishmaniosis; una enfermedad parasitaria que afecta gran parte de la población en nuestro país, principalmente las costas Atlántica y Pacífica y los valles de los ríos

Magdalena y Cauca; donde se crea el ambiente propicio para el crecimiento del insecto vector del género *Lutzomyia* y de los reservorios (mamíferos como el perro, el oso perezoso, la zarigüeya y los roedores) que permiten el posterior desarrollo de la enfermedad (21).

* Dirección para solicitar reimpresos

En el hombre, la enfermedad afecta la piel, las mucosas y los órganos del sistema mononuclear fagocítico, produciendo así los cuadros clínicos de leishmaniosis cutánea, mucosa y visceral, respectivamente. La Organización Mundial de la Salud, la señala como una de las enfermedades prioritarias para la investigación y para su control (21).

Diversos factores socioeconómicos y políticos influyen de manera considerable en la alta prevalencia de la leishmaniosis en Colombia, entre los que se incluyen(21):

- La poca información sobre este problema de salud por parte de la población que facilita el contacto del hombre con el vector infectado y favorece la cronicidad de las lesiones y sus complicaciones.
- La falta de implementación de programas de control en cuanto al diagnóstico y al tratamiento oportuno en las zonas endémicas.
- La escasa cantidad de sustancias activas disponibles en el mercado para el tratamiento de la enfermedad, las cuales presentan múltiples reacciones adversas.
- La falta de técnicas mas adecuadas para la evaluación clínica de nuevas sustancias “*in vivo*” con actividad leishmanicida.

Actualmente la evaluación de sustancias leishmanicidas *in vivo* se realiza en modelos animales (ratones o hámster) previo aislamiento y cultivo de los parásitos de *Leishmania ssp.* y su posterior inoculación con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento y producción de la infección. Dependiendo de la forma clínica de la enfermedad se utilizan diferentes esquemas de inoculación a saber (21):

- *Leishmaniosis visceral*: se utilizan las vías de administración intraperitoneal, intracardíaca o intravenosa para la inoculación de los parásitos. El desarrollo de la enfermedad se evidencia por la aparición de ascitis y deterioro de la condición física del animal.
- *Cutánea*: se inocula el parásito vía intradérmica en la almohadilla de alguna de sus extremidades. La enfermedad se evidencia por la aparición de lesión ulcerosa, costrosa o nodular.
- *Mucosa*: se inocula el parásito en la mucosa nasal y se evalúa el desarrollo de la enfermedad por la aparición de simplemente un eritema o de una lesión tipo nódulo o tipo úlcera.

El desarrollo de cualquier tipo de lesión, se evalúa macroscópicamente midiendo el grado de inflamación y la presencia del parásito se confirma al observar los amastigotes en un frotis que es coloreado con Giemsa y leído al microscopio (21).

Para el establecimiento de la infección, la leishmania inoculada por el vector debe hacerse intracelular y multiplicarse dentro de su célula hospedera (el macrófago); a pesar de que esta es una célula microbicida por excelencia, la leishmania es capaz de sobrevivir en su interior gracias a diferentes mecanismos que le permiten evadir la respuesta microbicida (1, 21).

De acuerdo con estos procesos de infección producidos por la *Leishmania* en macrófagos, se consideró factible adaptar el método de la “bolsa de aire” ampliamente utilizado en la evaluación de sustancias antiinflamatorias (6, 7) para evaluar sustancias con potencial actividad leishmanicida y por medio de ella obtener una microestación para el parásito, ya que dicha cavidad esta rodeada por macrófagos tipo A 50% y por fibroblastos del tipo B (50-90%). Estas células proporcionarían una estructura separada del resto de tejido por una fibrosis propia de la formación sinovial, con el flujo de macrófagos procedentes tanto de circulación sistémica como de las células constitutivas de la pared sinovial; que pueden ser infectados por *Leishmania* y por tanto en dicha bolsa se podría estudiar de sustancias la actividad leishmanicida de sustancias *in vivo*.

La técnica de la bolsa de aire, experimento realizado por Edwards y colaboradores en 1981 (7), proporciona un modelo interesante para el estudio de sustancias antiinflamatorias, se realiza con base en la formación de una cavidad de aire estéril a nivel dorsal en roedores donde puede detectarse la presencia de células involucradas en el proceso inflamatorio según lo observado en múltiples estudios (5, 8, 9, 10, 11,14, 15,16,20,), dicha cavidad puede utilizarse como cámara de cultivo celular porque genera una estructura similar a la membrana sinovial la cual esta constituida por macrófagos y fibroblastos (6). Por lo tanto, la bolsa de aire sería un medio propicio para el establecimiento del parásito *Leishmania ssp.* Es de anotar que los métodos de evaluación *in vivo* disponibles hasta ahora no permiten una medida exacta de la infección, por lo tanto, se requiere estandarizar una técnica que permita medir la infección en el modelo animal, una técnica

comparable, reproducible y que posibilite evaluar diferentes sustancias para incrementar las alternativas terapéuticas en el tratamiento de ésta parasitosis, a través de la invasión de los macrófagos presentes en la bolsa de aire.

Materiales y métodos

Reactivos biológicos:

Se utilizaron hámster machos del género *Mesocricetus auratus* de la cepa Chester Beatty Golden, exocriados y S.P.F. de una estrella, con edad aproximada de seis semanas y procedentes del Instituto Nacional de Salud de Bogotá D.C., Colombia. Los hámster se mantuvieron alojados de a dos animales por cubículo experimental de 30X20X15 cm, a una temperatura promedio de 20°C, 71% de humedad relativa y ciclos luz/oscuridad de 6 horas.

La dieta suministrada consistió en Rodentina® y agua ultrapurificada (osmosis inversa) a voluntad y como cama se utilizó viruta esterilizada en autoclave. Las condiciones higiénico sanitarias fueron vigiladas cuidadosamente para asegurar así el buen estado de salud de los animales y las medidas de salud y seguridad ocupacional correspondientes.

Para la inyección del aire vía subcutánea se utilizaron jeringas de 1.0 y 10 ml con agujas hipodérmicas estériles No 23, filtros de aire de 0.22 micras; los hámster se anestesiaron con Sevoflurano®; para la extracción del contenido de la bolsa de aire se utilizaron agujas tiranervios de 0.21 x 21 mm para el frotis.

Cultivo del parásito:

Se utilizaron parásitos de la cepa *Leishmania Viannia panamensis MHOM/CO/87/UA 140* aislada de un paciente Colombiano con leishmaniosis cutánea, crioconservada en el banco de cepas del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia cultivada in vitro en medio NNN.

Para obtener el parásito, se descongeló un vial y se hizo cultivo en masa en medio NNN modificado a 26°C, cosechando en la fase estacionaria temprana de crecimiento, es decir, cinco según la curva de crecimiento previamente determinada en el PECET. Los parásitos se centrifugaron a 2500 r.p.m. por 15 minutos, el sobrenadante se descartó y el sedimento

obtenido se lavó tres veces con PBS estéril pH 7,2 centrifugando cada vez a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Luego se hizo recuento en una cámara de Neubauer y la concentración se ajustó a 3×10^8 parásitos/ml de PBS estéril pH 7,2; posteriormente se hicieron diluciones entre 2×10^5 y 1×10^7 parásitos/ml.

Método de la "bolsa de aire":

El método utilizado es una adaptación de la técnica de la "bolsa de aire" descrita por Edwards (7); se basa en la formación de una cavidad de aire estéril a nivel dorsal en el hámster; dicha cavidad puede utilizarse como cámara de cultivo celular a la cual se le añaden diversos xenobióticos con el fin de estudiar sus efectos en cuanto a morfología, histopatología, actividad enzimática, producción de mediadores de la inflamación y otras funciones del revestimiento (2,8).

La formación de la bolsa se logra inyectando 10 ml de aire estéril vía subcutánea en el espacio interescapular del dorso de los hámster previa inducción anestésica con Sevoflurano®, la inyección de aire se repite cada cuatro días durante un mes; a partir del día 30, la bolsa se mantiene inyectando 10 ml de aire cada 10 días.

La adaptación de esta técnica consistió en inyectar la cámara de aire formada con promastigotes de *Leishmania Viannia panamensis* cepa *MHOM/CO/87/UA 140* a diferentes concentraciones, y observar la capacidad de la misma como medio de cultivo para este parásito y específicamente como microestación para la posterior evaluación de sustancias con actividad leishmanicida.

Determinación dosis infectiva 50:

Se tomó una población de 60 hámster de seis semanas de vida, los animales se dividieron en 6 grupos cada uno con 10 animales. Previa formación de la bolsa de aire, el día nueve un grupo se inoculó vía subcutánea con 1 ml de PBS (grupo control); los grupos 2,3,4,5 y 6 se inocularon vía subcutánea con: 2×10^5 , 6×10^5 , 1×10^6 , 6×10^6 y 1×10^7 parásitos por ml de PBS respectivamente. En los días 30, 60 y 90 post-infección, a cada reactivo biológico se le hizo frotis, extracción de tejido de la bolsa de aire y cultivo del exudado extraído con el fin de determinar la presencia de la infección.

Frotis:

Los días 30, 60 y 90, a cada uno de los animales se les realizó frotis con aguja tiranervios en la bolsa de

aire, luego se coloreó con Giemsa y se estudio al microscopio. El día 90 postinóculo, a los hámster se les administró CO₂ como medio de eutanasia; se tomaron muestras de la bolsa de aire (piel y músculo dorsal), de hígado y de bazo. Las muestras se fijaron en formol al 10 % para ser procesadas y coloreadas con los métodos de Hematoxilina - Eosina y Giemsa.

El estudio histopatológico de los frotis se realizó en el Departamento de Patología del Hospital Universitario San Vicente de Paul de la Universidad de Antioquia.

Cultivos:

Se utilizaron jeringas de 1 ml con 0.4 ml de PBS y 5000 UI de Penicilina sódica; se realizó aspirado de la bolsa y se llevo a medio de cultivo NNN, el cual se reviso y replico cada ocho días durante un mes.

Aprobación del comité de ética de animales de experimentación.

Para su ejecución, la metodología utilizada en esta investigación con los reactivos biológicos en cuanto a macroambiente, microambiente, manejo, procedimientos, anestesia y eutanasia contó con la aprobación del Comité de Ética de Animales de Experimentación de la Universidad de Antioquia y del Ministerio de Salud; además, se tuvo en cuenta la selección del punto final del experimento según el "Canadian Council on Animal Care" (CCAC) (4).

Los hámster se observaron diariamente dos veces al día y se pesaban una vez por semana; se registraba cualquier efecto negativo observado sobre la condición del animal en lo relacionado con el peso, la apariencia física y la conducta según la clasificación del CCAC (4).

Resultados y discusión

En esta investigación y según la clasificación de la CCAC, el peso, la apariencia física y la conducta de los hámster fue normal.

Según los resultados de histopatología, se logro formar y mantener la "bolsa de aire" en todos los especímenes. Se encontró permeable, durante el primer mes esta cubierta por varias hileras de células simulando el revestimiento articular y a su alrededor se encontró buen número de macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares y escasos mastocitos. Tres meses

postinóculo, el revestimiento interno de la "bolsa de aire" se transformó en una hilera de células similares a un mesotelio y a su alrededor hubo fibrosis, pocos linfocitos y ocasionalmente mastocitos; la población de macrófagos y de leucocitos polimorfonucleares desapareció.

Sin embargo, a pesar de que se formó la "bolsa de aire" no se logró comprobar el desarrollo de la infección. La evaluación al microscopio de los cortes histopatológicos coloreados con Hematoxilina – Eosina y de los frotis coloreados con Giemsa no demostró la presencia de amastigotes de *Leishmania* y tampoco se aislaron promastigotes de los aspirados de la bolsa de aire cultivados en medio NNN.

Puesto que no hubo infección no se pudo determinar la dosis infectiva 50 considerando que se evaluó un rango amplio de concentraciones de parásitos (desde 2×10^5 hasta 1×10^7).

La no visualización del proceso de infección pudo deberse a la suma de factores tales como:

- *Baja infectividad de la cepa de Leishmania (V) panamensis utilizada:* Estudios anteriores con hámster dorados indican su utilidad como modelo experimental de infección con *Leishmania Viannia* (14, 15, 19, 21,22); en dichos trabajos se documenta la reproducibilidad de la infección de los animales inoculados con muestras clínicas crioconservadas o aisladas recientemente. Se plantea por consiguiente la posibilidad de que la cepa utilizada no presentó suficiente capacidad infectiva en los animales expuestos, debido posiblemente a sucesivos repiques en los medios de cultivo para el mantenimiento de la cepa produciendo cambios bioquímicos que influyen en el proceso de infección del macrófago. Sería recomendable realizar estudios piloto con la cepa utilizada y otras cepas de *Leishmania* para determinar, la patogenicidad y la dosis necesaria para producir infección *in vitro* en macrófagos producidos en bolsas de aire y posteriormente extrapolar esos resultados a ensayos *in vivo*.
- *La vía de inoculación:* el inóculo se realizo subcutáneamente a nivel del espacio interescapular, previa formación de la bolsa, dentro de la cavidad formada; en el ciclo biológico de *Leishmania*, el insecto vector inocular los parásitos en la dermis

del hospedero directamente, pero en la adaptación propuesta el revestimiento de la cámara proporciona una gran área de contacto en donde los parásitos deben adaptarse a las nuevas condiciones, y suponiendo una baja capacidad infectiva de la cepa inoculada sería un factor más a considerar para la no presencia de infección, por consiguiente debe estudiarse a mayor profundidad las variables que pudiera introducir esta nueva vía de inoculación en el proceso de infección

- *Respuesta inmune:* Los promastigotes inoculados viables podrían ser destruidos en los fagolisosomas activados, la piel es un componente importante del sistema inmunológico donde ocurren una serie de respuestas complejas, tanto humorales y celulares; en ella se encuentran células inmunocompetentes como son las células de Langerhans epidérmicas, queratinocitos y linfocitos T; la unidad perivascular dérmica que incluye las células endoteliales, pericitos vasculares, mastocitos y dendrocitos dérmicos; y citoquinas interactuantes y quimocinas. Las células de Langerhans y los queratinocitos producen monoquinas que pueden contribuir con la migración de linfocitos T epidermotrópicos (4, 20), favoreciendo

la activación de una respuesta Th1 que puede resolver el proceso como se ha observado en ratones resistentes (1). Sería pertinente en este sentido un monitoreo del patrón de citoquinas producidos en el proceso de formación de la bolsa y postinfección ya que esto da indicios del tipo de proceso inmunológico que se lleva a cabo y que en el presente trabajo no fue posible realizar.

La suma de los factores anteriores: respuesta inmune, baja infectividad de la cepa utilizada y la nueva ruta de infección que plantea una cavidad preformada con una gran área de contacto pudieron incidir en los resultados observados. No es posible afirmar que la "bolsa de aire" sirve o no como medio de cultivo para la *Leishmania* ya que no se logró observar infección en el reactivo biológico.

La adaptación de esta técnica debe considerarse con mayor detalle, en lo relacionado con el tipo de células que se producen durante el proceso de formación de la bolsa en hámster dorado, aislamiento de macrófagos de la misma y cultivo *in vitro* de éstos para evaluar su capacidad de respuesta a la infección y perfil celular del proceso de infección *in vivo*.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó bajo la financiación del *Comité Para el Desarrollo de la Investigación* (CODI) de la Universidad de Antioquia. Agradecemos al *Programa para el Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET)* de la Universidad de Antioquia por su apoyo logístico y al Dr. Mario Robledo del *Departamento de Patología del Hospital Universitario San Vicente de Paul* por la realización de los análisis histopatológicos.

Summary

Standardization of the "air pouch" method to be used in the evaluation in vivo of leishmanicide substances

Currently, the in vivo evaluation of Leishmanicide substances is performed in animal models (mice, hamsters) to induce infection, the isolation and culture of Leishmania spp. is previously done, in order to inoculate promastigotes in a stationary phase of growth between the shoulders, subcutaneously, to make an airpouch. In this research the objective was to standardize the best method to evaluate the activity of natural, synthetic or hemi-synthetic substances against a strain of Leishmania Viannia panamensis MHOM/CO/87/UA140 in 60 gold Hamsters (Mesocricetus auratus). A smear was done from the air pouch during days 30, 60 and 90 postinfection of each hamster and then cultured on NNN media, to determine the presence of infection. At day 90 the hamsters were submitted to euthanasia and new smears were taken. A sample of each air pouch was obtained to then be processed by histopathology. Hematoxyline and Eosine and Giemsa stains were used. The air pouch were found well established and in all cases was permeable, and internally covered for several cell layers like articular membranes. There were macrophages, polymorphonuclear cells and monocytes, surrounding

it. The infection could not be observed in this study in spite of there was an establishment of a well done air pouch in gold hamsters and the high load of parasites; several reasons could be involved: the Leishmania Viannia panamensis strain pathogenic, the area of subcutaneous route of infection, the immunity and phagolysosomal response. The methodology of handle and experimentation with the animals were approved for the Bioethics Committee of Antioquia University and the Health Ministry

Key words: Air pouch, Biologic reagent, Distress, Infective dose, Leishmania panamensis.

Referencias

- Alvar J. Las Leishmaniasis de la biología al control. Junta de Castilla y León. Madrid, España 1997; 73-107.
- Becherucci D, Donati D, Parreti M. and Parente L. The release of interleukin -1- like activity by macrophages in two models of immunological inflammation in the rat. Agents and Actions, 1989; 28 (3-4): 243-247.
- Bos JD and Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology, Immunol. Today, 1993; 14:75-78.
- Canadian council of animal care (CCAC). Normas sobre La selección del punto final apropiado en experimentos que se utilizan animales para investigación científica, enseñanza y pruebas de laboratorio. Ottawa: CCAC, 2000. 33 p.
- Castro AG, Esaguy N, Macedo PM, Aguas AP and Silva MT. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. Infection and Immunity. 1991; 59 (9): 3009-3014.
- CYTED. Manual de técnicas de investigación. 1995: 88-93.
- Edwards JCW, Sedgwick AD and Willoughby DA. The formation of a structure with the features of sinovial linin by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. J. Phatol. 1981; 134: 147-156.
- Esser RE, Eyerman MC, Port CD and Anderson M. Proinflammatory effects of interleukin -1- in the rat air pouch. J. Tiss. Reac. 1989; 16 (6): 291- 300.
- Ferrandiz M and Foster SJ. Tumor necrosis factor production in a rat air pouch model of inflammation. Agents and Actions. 1991; 32 (3-4): 294-298.
- Griwold E. SK/F86002 a structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid. Biochemical Pharmacology. 1987; 36 (20): 3463-3470.
- Magilavy DB. Animal models of chronic inflammatory arthritis. Animal models of inflammatory arthritis. 1990; 259: 39-45.
- Martínez JE, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG. Metastatic capability of Leishmania (Viannia) panamensis and Leishmania (Viania) guyanensis in golden hamsters. J. Parasitol. 1991; 77(5): 762-768.
- Molina S, Chinchilla M. Multiplicación in vitro de Leishmania mexicana en macrófagos de hámster y ratones infectados y no infectados. Parasitología al Día. 1996; 20: 79-85.
- Ohuchi K, Watanabe M, Yoshimura Y, Hirasawa N. And Tsurufuji. Slow reacting sustance in the exudate of allergic air pouch inflamation in rats. Prostaglandins Leukotrienes and Medicine. 1983; 10: 3009-3014.
- Omata M, Watabe M, Hirasawa N, Tsurufuji S, Mue S, Ohuchi K. A. Role of peripheral leukocytes in vascular permeability and edema formation in air pouch type allergic inflammation in rats. J. pharmacobio-Dyn. 1991; 14: 267-275.
- Tanabe J, Watanabe M, Kondoh S, Mue S. and Ohuchi K. Possible roles of protein kinases in neutrophil chemotactic factor produccion by leucocytes in allergic inflammation in rats. Br. J. Pharm. 1994; 113(4):1480-1486.
- Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G and Sánchez MA. Epidermal immune privilege in american cutaneous leishmaniasis. In «Molecular and immune mechanims in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis», edited by Felix J. Tapia, Gisela Cáceres-Dittmar and Martín Sánchez, 1996:139-152.
- Travy BL, Osorio Y and Saravia N. The inflammatory response promotes cutaneos metastasis in hamsters infected with Leishmania (Viannia) panamensis. J. Parasitol. 1996; 82 (3): 454-457.
- Travy BL, Rey-Ladino J and Saravia NG. Behavior of Leishmania braziliensis s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. J. Parasitol. 1988; 74 (6):1059 - 1062
- Tsurufuji S, Yoshino S and Ohuchi K. Induction of an allergic air-pouch inflammation in rats. Int Arch Aller Appl Imm. 1982; 69 (3): 189-198.
- Velez ID y Agudelo SP. Leishmaniosis. Medellín:Universidad de Antioquia.1996, 35p