

Infección de fibroblastos de piel de animales con distinto grado de susceptibilidad a *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

Miguel Angel Minero¹, Misael Chinchilla², Olga Marta Guerrero² & Alfredo Castro²

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. Fax: (503) 225-8822.

² Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Fax: (506) 225-4384.

Recibido 28-X-2002. Corregido 18-X-2003. Aceptado 28-X-2003.

Abstract: Infection and multiplication of *Leishmania infantum* and *L. mexicana* inside of skin fibroblasts from hamsters, mice and rats was achieved. This process was demonstrated either by counting parasites inside the stained cells or by electronic microscopy studies. In addition multiplication rate differences in the cells from these rodent species were determined, for *L. infantum* as well as for *L. mexicana*. Parasite development in hamsters and mice fibroblasts was evident but there was not multiplication in rat cells showing that apparently they are refractory to *Leishmania* infection. These results suggest that the parasite affinity for each animal, as well as any intracellular environment resistance, could involve genetic factors in the parasite multiplication. On the other hand, presence of amastigote multiplication inside of parasitophorus vacuole, showed by electronic microscopy images, probes a true parasite transformation. Therefore it is suggested that fibroblasts could work as host cells for parasite survival and permanency in the infected animals.

Key words: Trypanosomatidae, *Leishmania*, cell culture, fibroblasts.

El término genérico de leishmaniasis se refiere a una parasitosis con diversas manifestaciones clínicas que se distribuyen en al menos 88 países alrededor del mundo, los cuales se ubican dentro de las zonas tropicales y subtropicales donde existe transmisión activa del agente etiológico (Grimaldi y Tesh 1993, Alvar *et al.* 1997). Tales manifestaciones clínicas han sido catalogadas en 3 síndromes: cutáneo, mucocutáneo y visceral, según sea el grado de compromiso de tejidos y órganos (Pearson y Queiroz-Sousa 1996). Este patrón clínico, sin embargo, tiene cada vez menos utilidad práctica pues se ha observado que factores como la inmunosupresión adquirida, la desnutrición y la constitución genética del individuo, se combinan con los factores de virulencia propios de las diferentes especies del parásito para produ-

cir cuadros clínicos que varían de persona a persona y de una zona geográfica a otra (Medrano *et al.* 1998, Wolday *et al.* 1999, Guerboj *et al.* 2000).

Los parásitos del género *Leishmania* desarrollan su ciclo vital utilizando un insecto como vector y a un vertebrado como reservorio susceptible. Al alimentarse, el insecto inyecta formas flageladas llamadas promastigotos, los cuales penetran en macrófagos y células del sistema retículoendotelial donde se convierten en amastigotos. Estos últimos tienen la capacidad de multiplicarse y de infectar a otros tipos celulares donde pueden permanecer indefinidamente.

La capacidad de las células para inhibir la multiplicación parasitaria se ha correlacionado con diferencias en la resistencia natural de

diferentes roedores, para lo cual se ha utilizado cultivos de macrófagos peritoneales como células blanco para la infección *in vitro* con *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Besnoitia jellisoni* (Chinchilla *et al.* 1995, 1996). Otras investigaciones, han informado de diferentes factores que intervienen en la multiplicación de *Leishmania spp.* en macrófagos peritoneales de *Mesocricetus auratus* (Molina y Chinchilla 1996), *Mus musculus* NGP (Méndez *et al.* 1996) y *Rattus norvegicus* (Bastardo *et al.* 1983).

Algunos investigadores han sugerido que al igual que sucede en macrófagos, el parásito puede invadir las células somáticas no inmunocompetentes del hospedero susceptible tales como los fibroblastos de la piel y sobrevivir de manera más efectiva en virtud de un medio ambiente interno menos hostil (Hervás-Rodríguez *et al.* 1996). No se relaciona aún a los fibroblastos dérmicos con la patología de la leishmaniasis aunque se sabe de su capacidad fagocítica (Segal 2001) y de la producción de compuestos antibacterianos luego del contacto con Interferón- γ (Wang 1996).

En el presente estudio se desarrolla un modelo experimental *in vitro* de cultivo de fibroblastos de piel de tres especies de roedores, en contacto con promastigotos de *Leishmania mexicana* y *L. infantum*, con el fin de determinar si existen diferencias en cuanto a la susceptibilidad de infección por especies biológicamente disímiles del parásito y si aquellas se relacionan con la constitución genética de los individuos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para estos experimentos se utilizaron animales de tres a cinco días de nacidos de las especies: hámster (*Mesocricetus auratus*), ratón blanco NGP (*Mus musculus*) y rata blanca Sprague Dowley (*Rattus norvegicus*), suministradas por el Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) de la Universidad de Costa Rica. Se siguió la metodología descrita por Chinchilla y Frenkel (1984), con algunas modificacio-

nes. Brevemente, las crías se sacrificaron en cámara de éter y bajo condiciones de esterilidad se separó la piel, que a su vez fue sometida a tres ciclos de disgregación celular con tripsina al 0.25% a 37°C y agitación mecánica por cinco a siete minutos cada vez. El sobrenadante obtenido se mezcló con el doble de volumen de Minimal

Essential Medium Eagle® (Sigma) con 10% de suero bovino fetal (MEM-10%SBF) para inactivar la tripsina. La suspensión celular se cultivó a 37°C más 5-10% de CO₂ y humedad hasta la formación de una monocapa. Una semana después, se tripsinizó por diez minutos para obtener una nueva suspensión celular que fue ajustada con hemocitómetro de Newbauer a una concentración aproximada de 1.0 x 10⁵ fibroblastos por ml. Se colocaron 0.3 ml de esa suspensión en cada uno de cuatro cubreobjetos 22x22 mm estériles por caja de Petri y se incubaron por 24 horas a 37°C más 5-10% de CO₂ y humedad para luego lavar con solución de Hanks® (Sigma).

Las suspensiones de promastigotos se hicieron en MEM-10% SBF a partir de cultivo en fase estacionaria en medio de Schneider® (Sigma) a 32°C de *L. infantum* aislada del primer caso humano en Costa Rica (Carrillo *et al.* 1999) y de *L. mexicana* (OCR) también aislada de un caso humano, en medio de Rugai a 25-28°C. Los cultivos usados en estos experimentos provenían de animales infectados previamente, por los que eran de reciente aislamiento. A cada cubreobjeto se le agregó 0.1 ml de la suspensión del parásito, permaneciendo en contacto con los fibroblastos hasta 168 horas como máximo. Durante este intervalo, se tomaron cubreobjetos a las 24, 72, 120 y 168 horas post-infección y se tiñeron con el colorante de Giemsa por siete minutos para revisar por microscopía de luz con objetivo de inmersión.

En cada uno de los cubreobjetos se contaron 500 células (CT) por sextuplicado, determinándose el número de células infectadas (CI) y el número total de amastigotos intracelulares (AT). Para obtener una correlación estadística de los datos para las células totales se

dividió el cómputo de amastigotos intracelulares entre las células totales y se multiplicó por cien. Para las células infectadas se dividió el número de los amastigotos intracelulares entre las células infectadas y se multiplicó por cien. Todos estos datos se analizaron con la prueba “*t*” de Student en búsqueda de significancia estadística con un porcentaje de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Simultáneamente se realizó un estudio ultraestructural de fibroblastos infectados, utilizando la técnica de baño de hielo y aumento de la cinética molecular de la solución por radiación del horno de microondas descrita por (Howood *et al.* 1990, Hernández y Guillén 2000). Del bloque de material obtenido se hicieron cortes finos para examinar al microscopio electrónico de transmisión (modelo Hitachi H7100).

RESULTADOS

Los promastigotos de *L. infantum* y *L. mexicana* (OCR) inoculados en los cultivos de fibroblastos de piel de hámster, ratón y rata se comportaron en forma diferente con respecto a la afinidad hacia las células de los animales y la reproducción dentro de éstas a través del tiempo. El número de amastigotos de *L. infantum* a las 24 horas post-infección fue de 7.2, 4.0 y 0.2 en 100 fibroblastos totales de hámster, ratón y rata respectivamente. Todos los datos siguientes conservan el orden anterior a menos que se indique lo contrario. A las 72 horas fue de 24.3, 13.1 y 0.1; a las 120 fue de 57.8, 24.1 y 0.2 y a las 168 horas fue de 150.6, 1178.4 y 0.2. Para cien células infectadas el número de parásitos fue de 180.0, 106.7 y 100.0 (24h); 171.8, 140.8 y 100 (72h); 238.7, 155.1 y 100.0 (120h) de 402.7, 1376.9 y 100.0 a las 168 horas (Fig. 1).

Con respecto a *L. mexicana* (OCR), el número de amastigotos fue menor en todos los casos en comparación con *L. infantum*. Por cien células totales se obtuvieron los siguientes valores en hámster, ratón y rata respectivamente: 1.4, 1.1 y 0.1 (24h); 1.7, 2.8 y 0.3 (72h);

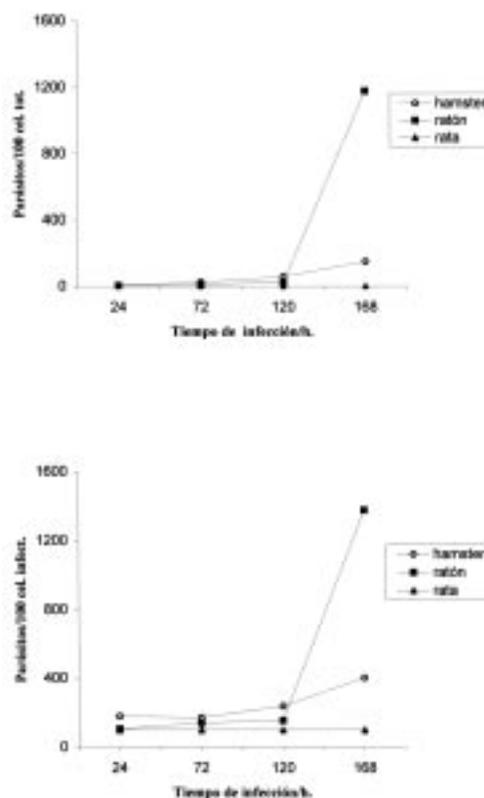


Fig. 1. Curva de crecimiento de *Leishmania infantum* en fibroblastos.

Fig. 1. Growth rate of *Leishmania infantum* in fibroblasts.

72.0, 16.4 y 0.5 (120h) y 90.7, 33.8 y 1.9 (168h). En relación con cien células infectadas el número de parásitos fue de 140.0, 133.3 y 100.0 (24h); 188.9, 194.0 y 150.0 (72h); 342.7, 270.0 y 125.0 (120h) y 340.2, 314.7 y 200.0 (168h) (Fig. 2). Se observó significancia estadística ($p < 0.05$) entre las diferencias de los números de parásitos registrados.

El análisis ultraestructural de fibroblastos infectados reveló una mayor vacuolización en comparación con las células sin infectar. Por otra parte, se encontraron numerosas y amplias vacuolas parasitóforas en el citoplasma y dentro de ellas, amastigotos únicos o en grupos. En ellos fue notorio el núcleo con cromatina

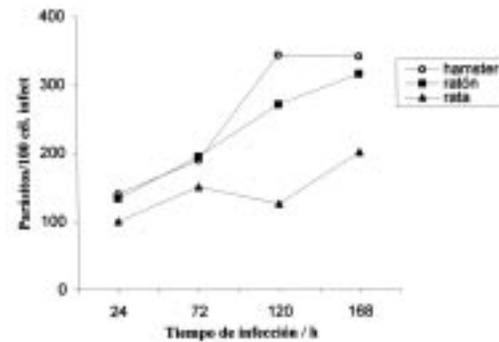
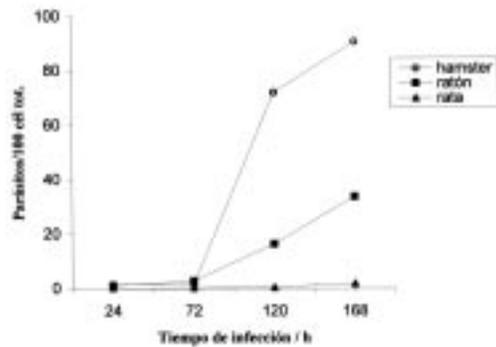


Fig. 2. Curva de crecimiento de *Leishmania mexicana* (OCR) en fibroblastos.

Fig. 2. Growth rate of *Leishmania mexicana* (OCR) in fibroblasts.

densa y un nucleolo, el cinetoplasto alargado, los microtúbulos subpeliculares dispuestos exactamente por debajo de la membrana plasmática y la porción interna del flagelo en conformación 9+2, típico de los organismos eucariotas (Fig. 3). La reproducción de los amastigotos fue evidente por la división flagelar observada dentro de las vacuolas parasitóforas (Fig. 4), descartándose que su presencia tuviera como origen una simple transformación de promastigoto a amastigoto luego de la entrada al fibroblasto.

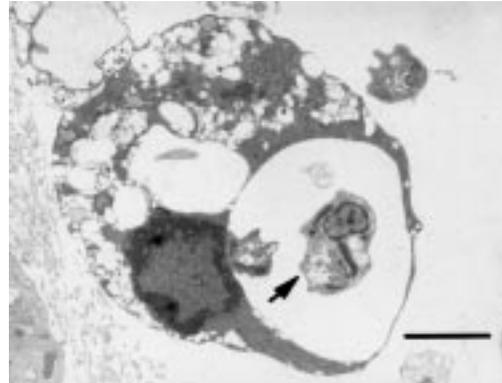


Fig. 3. Fibroblasto de piel de hámster en cultivo infectado por *Leishmania infantum*. Nótese la vacuolización intracelular y los amastigotos dentro de las vacuolas parasitóforas. Microscopía de trasmisión. Barra=2.1µm.

Fig. 3. Hamster skin fibroblasts infected with *Leishmania infantum*. Observe intracellular vacuolization and amastigote forms inside the parasitophorus vacuole. Transmission microscope. Bar=2.1µm.



Fig. 4. Fibroblasto de piel de hámster en cultivo infectado por *Leishmania infantum*. Nótese el amastigoto dentro de la vacuola parasitófora y el flagelo en división. Microscopía de transmisión. Barra=0.4 µm.

Fig. 4. Hamster skin fibroblast infected with *Leishmania infantum*. Observe amastigote forms with dividing flagella inside the parasitophorus vacuole. Transmission microscope. Bar=0.4 µm.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos llama la atención que *L. infantum* presenta el mayor número de parásitos por cien células totales tanto en hámster como en ratón, en comparación con *L. mexicana* (OCR). Estos resultados contrastan con lo observado por Chang (1978) en fibroblastos de piel humana, ya que las dos especies derivadas de casos viscerales no penetraron en las células. El autor aduce diferencias en mecanismos de internalización que no se observó con las células de ratón y hamster. Sin embargo, existe una leve concordancia entre ambos experimentos, pues la cepa de origen cutáneo fue la que presentó las mayores tasas de crecimiento. A raíz de esto se puede afirmar que ambas especies presentan distinto grado, no sólo de afinidad por las células de los roedores, sino también de resistencia en el espacio intracelular. El uso de aislamientos recientes hechos a partir de lesiones en animales, permite relacionar esas características con la infectividad natural de cada uno y no a un potencial de virulencia atenuado debido a la permanencia prolongada en medios de cultivo.

En contraste con lo anterior, en los fibroblastos de rata se observaron escasas formas, incluso en los intervalos más tardíos de todos los experimentos. Los valores menores en los radios de crecimiento de *L. infantum* podrían indicar que se inhibe la reproducción y aunque en *L. mexicana* (OCR) se obtuvieron datos levemente mayores, si se comparan éstos con los de hámster y ratón, se observa una clara resistencia de los fibroblastos de rata frente al contacto con las dos especies del parásito, por lo que se concluye que en estas células es difícil la infección. Esto podría deberse a diferencias en la expresión de enzimas tales como la Mg_2^+ ATPasa y Ca_2^+ ATPasa encontradas en los procesos de adhesión e internalización de *L. amazonensis* en cultivos primarios de fibroblastos (Corte-Real *et al.* 1995). Debe recordarse que en estudios anteriores se ha demostrado la resistencia natural de este roedor frente a la infección con otros protozoarios, tales como *Toxoplasma gondii* (Guerrero *et al.* 1997,

Chinchilla *et al.* 1981, Troyo y Chinchilla 2003) pero es la primera vez que se le relaciona con *Leishmania* sp.

Anteriormente se ha hecho referencia a que las especies del género, *Leishmania* infectan y se transforman dentro de células somáticas, entre ellas los fibroblastos de piel (Schwartzman y Pearson 1985, Hervás-Rodríguez *et al.* 1996), pero se duda que la reproducción intracelular sea posible (Chang 1978), por lo menos en cuanto a las infecciones en fibroblastos humanos se refiere. En concordancia con la primera aseveración, los hallazgos presentados en este estudio confirman la capacidad de la célula de albergar formas típicas de amastigotos dentro de verdaderas vacuolas parasitóforas citoplasmáticas. En contraste con lo anterior, se demuestra la multiplicación del parásito como un hecho inequívoco, evidenciado por la presencia de estructuras dobles dentro de la bolsa flagelar. Ya sea en el estadio intracelular como extracelular, es el flagelo el primero en dividirse durante la reproducción, de tal manera que puede afirmarse que las formas únicas y múltiples observadas dentro de las vacuolas, no son sólo el producto de una simple transformación de promastigoto a amastigoto sino también de un verdadero desarrollo intracelular. Esta capacidad de multiplicación de *Leishmania* sp. en células de piel, de por sí no fagocíticas, ha permitido sugerir a Bogdan *et al.* (2000) que éste podría ser un mecanismo de seguridad para el parásito que le permitiría mantenerse en las infecciones latentes, ya que así obviarían la acción fagocítica de los macrófagos presente en la mayoría de los animales crónicamente infectados (Mauel 1990).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a través del proyecto N° 803-A0-032. Se agradece al Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) por el suministro y cuidado de los animales de laboratorio utilizados y al Centro de Investigación

en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica, por el trabajo de gran calidad que brindó.

RESUMEN

En este estudio se presenta un modelo *in vitro* de cultivo de fibroblastos de piel de hámster, ratón y rata hecho con el propósito de determinar diferencias en cuanto a la susceptibilidad a la infección por dos especies del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Se realizó además un estudio ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión con el fin de establecer si las formas intracelulares observadas correspondían a multiplicación interna o a fagocitosis múltiple. Se estudió la multiplicación de los parásitos en los fibroblastos de las tres especies de roedores infectados tanto por *Leishmania infantum* como por *L. mexicana* (cepa OCR) y las diferencias entre las tres fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se observó la reproducción del parásito en las células de hámster y ratón no así en las de rata, razón por la cual a este último animal se le consideró refractario a la infección. Con base en lo anterior se sugiere que la afinidad de un protozooario por las células de un individuo así como la resistencia al ambiente intracelular pueden depender de la constitución genética de este. El análisis ultraestructural demostró la reproducción de los amastigotes dentro de vacuolas parasitóforas por lo que se descarta que la presencia de estos se deba a su transformación luego de la entrada al fibroblasto. Se sugiere entonces que dichas células podrían servir para la supervivencia del parásito y la permanencia de este parásito en los animales infectados.

REFERENCIAS

- Alvar, J., C. Cañavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jiménez, F. Laguna, R. López-Velez, R. Molina & J. Moreno. 1997. *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus coinfection: the first ten years. Clin. Microbiol. Rev. 10: 298-319.
- Bastardo, T., L. Arcay & F. Tejero. 1983. Interaction of avirulent *Leishmania spp* with rat peritoneal macrophages. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 78: 21-26.
- Bogdan, C., N. Donhauser, R. Doring, M. Rollinghoff, A. Diefenbach & M.G. Rittig. 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. J. Exp. Med. 191: 2121-2130.
- Carrillo, J., M.Chinchilla, B. Valverde, O. Porras & L. Mora. 1999. Visceral Leishmaniasis in Costa Rica: First Case Report. Clin. Infect. Dis. 29: 678-679.
- Chang, K.P. 1978. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts *in vitro*: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 1084-1096.
- Chinchilla, M., M. Alfaro & O.M. Guerrero. 1981. Adaptación natural de la rata blanca a *Toxoplasma gondii*. Rev. Biol. Trop. 29: 273-282.
- Chinchilla, M. & J. Frenkel. 1984. Resistencia a la infección por *Toxoplasma* *in vitro* inducida por mediadores linfocitarios en células no fagocíticas de ratón y hámster. Inmunología. 3: 144-150.
- Chinchilla, M., L. Reyes & O. Guerrero. 1995. Resistance to intracellular parasites correlates with species differences in ability of macrophages to inhibit parasite replication. Immunol. Infect. Dis. 5: 83-87.
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero, L. Reyes & E. Abrahams. 1996. Susceptibilidad de la rata *Sigmodon hispidus* (Rodentia: Cricetidae) al *Toxoplasma gondii* (Eucoccidia: Sarcocystidae). Rev. Biol. Trop. 44: 265-268.
- Corte-Real, S., C.B. Santos & M.N. Meirelles. 1995. Differential expression of the plasma membrane Mg_2^+ ATPase and Ca_2^+ ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts *in vitro*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 27: 359-366.
- Grimaldi, G. & R. Tesh. 1993. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev. 6: 230-250.
- Guerbouj, S., I.Gizani, K. Victoir D. Le Ray & J.C. Dujardin. 2000. Parasite candidate vaccines: a warning from polymorphic *Leishmania* populations. Parasitol. Today. 16: 265.
- Guerrero, O., M. Chinchilla & E. Abrahams. 1997. Increasing of *Toxoplasma gondii* (Coccidia, Sarcocystidae) infections by *Trypanosoma lewisi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in white rats. Rev. Biol. Trop. 45: 887-882.
- Hernández, F. & R. Guillén. 2000. Microwave processing for scanning electron microscopy. Eur. J. Morphol. 38: 109-111.
- Hervás-Rodríguez, J., E. Mozos, A. Méndez, J. Pérez & J.C. Gómez-Villamandos. 1996. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts *in vivo*. Vet. Pathol. 33: 469-473.
- Howood, D., G. Milne & J. Penston. 1990. A comparison of microwaves and heat alone in the preparation of tissue for electron microscopy. Histochem. J. 22: 358-364.

- Mauel, J. 1990. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *J. Leukoc. Biol.* 47: 187-193.
- Medrano, F., C. Cañavate, M. Leal, C. Rey, E. Lissen & J. Alvar. 1998. The role of serology in the diagnosis and prognosis of VL in patients infected with HIV type 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 155-162.
- Méndez, S., M. Nell & J. Allunda. 1996. *Leishmania infantum*: infection of macrophages in vitro with promastigotes. *Internat. J. Parasitol.* 26: 619- 622.
- Molina, S. & M. Chinchilla. 1996. Multiplicación in vitro de *Leishmania mexicana* en macrófagos de hámster y ratones infectados y no infectados. *Parasitol. Al Día.* 20: 79-85.
- Pearson, R. & A. Queiroz-Souza. 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 22: 1-13.
- Schwartzman, J. & R. Pearson. 1985. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 850-855.
- Segal, G., W. Lee, P. Arora, M. McKee, G. Downey & C.A. McBulloch. 2001. Involvement of actin filaments and integrins in collagen phagocytosis by human fibroblasts. *J. Cell.Sci.* 114: 119-129.
- Troyo, A. & M. Chinchilla. 2003. *In vitro* multiplication of *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in mouse, rat, and hamster astrocytes. *Rev. Biol. Trop.* 51: 639-646.
- Wang, R., A. Ghahary, Y. Shen, P.G. Scott & E.E. Tredget. 1996. Human dermal fibroblasts produce NO and express both cNOS and iNOS isoforms. *J. Invest. Dermatol.* 106: 419-427.
- Wolday, D., N. Berhe, H. Akuffo *et al.* 1999. *Leishmania*-HIV intercation: immunopathogenic mechanisms. *Parasitol. Today.* 15: 182-187.

