

Efecto de la diminacina en hámsteres inoculados con *Leishmania chagasi*

Burna, A.N.; Catuogno, M.S.; Sánchez Negrette, M.; Mirad, A.; Maccio, O.A.

Cátedra Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel-Fax: 54-03783-425753. E-mail: patgral@vet.unne.edu.ar.

Resumen

Burna, A.N.; Catuogno, M.S.; Sánchez Negrette, M.; Mirad, A.; Maccio, O.A.: Efecto de la diminacina en hámsteres inoculados con *Leishmania chagasi*. Rev. vet. 24: 2, 133-137, 2013. La leishmaniosis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania*, que afecta al hombre y animales a través de la picadura de insectos infectados. La diminacina es una droga con actividad *in vitro* inhibitoria del crecimiento de *Leishmania donovani*; también ha sido utilizada para el tratamiento contra tripanosomosis y babesiosis. El objetivo del presente trabajo fue comprobar el efecto de diminacina *in vivo* como tratamiento antileishmaniásico en hámsteres, y en caso afirmativo transpolarla como alternativa terapéutica para el control y posible erradicación de la leishmaniosis en caninos. Se utilizaron 26 hámsteres agrupados en cuatro lotes de 6-7 animales cada uno: (a) inyectados con diminacina, (b) inoculados con *Leishmania chagasi*, (c) inoculados con *L. chagasi* e inyectados con diminacina, y (d) controles. La inoculación se efectuó con un macerado de bazo extraído de un canino naturalmente infectado con *L. chagasi*. La diminacina fue administrada a razón de 3,5 mg/kg vía IM. Los frotis y cortes histopatológicos de los hámsteres infectados revelaron amastigotes de *L. chagasi*. Los ejemplares infectados y tratados con diminacina mantuvieron un mejor estado de salud que aquéllos privados de tratamiento, lo cual sugiere que la droga tendría un efecto benéfico en el organismo del animal infectado.

Palabras clave: diminacina, *Leishmania chagasi*, inoculación, hámster.

Abstract

Burna, A.N.; Catuogno, M.S.; Sánchez Negrette, M.; Mirad, A.; Maccio, O.A.: Effect of diminazine in hamsters inoculated with *Leishmania chagasi*. Rev. vet. 24: 2, 133-137, 2013. Leishmaniosis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which is transmitted to human beings by the bite of infected insects. Diminazine is a drug with proven *in vitro* growth inhibition activity of *Leishmania donovani* and has also been used for the treatment against trypanosomosis and other parasitic diseases. The aim of this study was to determine the effect of diminazine *in vivo* as an antileishmanial drug in hamsters for the possible extrapolation and thus potential use as a therapeutic alternative in dogs. Twenty six hamsters were divided into four groups, two groups of 6 animals each, and two groups of 7 each. Some animals were inoculated IM with macerated spleen from a dog naturally infected with *Leishmania chagasi*. The diminazine treated group and the control animals inoculated with the protozoa presented amastigotes of *L. chagasi* in smears and in histopathological sections. Diminazine treated animals remained in better health state unlike the control group inoculated with *L. chagasi*. Results suggest that diminazine would have a beneficial effect in infected dogs.

Key words: diminazine, *Leishmania chagasi*, inoculation, hamster.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania*. Es una infección antroponozoonótica distribuida en diferentes áreas del planeta, que se transmite al hombre por la picadura de insectos vectores⁸. La manifestación clínica que incluye compromiso de las vísceras es conocida como leishmaniosis visceral y es producida por el “comple-

jo donovani” que incluye las especies *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. En el Nuevo Mundo la forma visceral es fundamentalmente causada por *L. chagasi* y transmitida por el vector *Lutzomyia longipalpis*^{2,4}.

Estudios de la infección en ratones, plantean que este modelo no reproduce las características de la leishmaniosis visceral activa en seres humanos, y que el ratón muestra un rápido aumento de la densidad parasitaria con inducción de una respuesta celular específica capaz de controlar la infección¹¹. Diferente comportamiento se registró al emplear el hámster como modelo

experimental en el estudio de la leishmaniosis visceral activa, pues en ellos hay pérdida de la respuesta inmune celular específica al antígeno, de forma similar a lo que ocurre en el hombre¹². Se ha demostrado que la infección sistémica por *L. donovani* en hámsteres resulta en un aumento progresivo de la carga parasitaria en hígado y bazo, hepatoesplenomegalia, caquexia, pancitopenia y muerte¹⁰.

Respecto al diagnóstico en los caninos, los cuadros clínicos, aunque muy variables y poco específicos, son orientadores siempre que se apoyen en una anamnesis exhaustiva que ofrezca datos epidemiológicos relevantes como ser: hábitat, tipo de actividad, tiempo de exposición al vector, zona geográfica y procedencia⁷. En zonas enzoóticas, un solo síntoma compatible debe generar la sospecha de existencia de leishmaniosis e inducir la realización de pruebas diagnósticas específicas para confirmarla.

Se considera “sospechoso” todo animal que proceda de una zona enzoótica o que haya permanecido en la misma durante el período de mayor actividad del vector¹³. Por su fiabilidad, el diagnóstico de elección es el parasitológico. La observación del parásito por visualización directa (punción de ganglios, médula ósea, biopsia cutánea), además de técnicas de biología molecular (PCR) y/o xenodiagnóstico (infección de *Phlebotomus*) son las pruebas determinantes^{1,6}.

El limitado conocimiento de los mecanismos por los cuales los parásitos adquieren resistencia a las drogas, genera una carga adicional en el desarrollo de las políticas de salud pública para el control de esta parasitosis³. La diminacina es una droga con probada actividad (*in vitro*) inhibitoria del crecimiento de *Leishmania donovani*, mostrando mayor efecto a altas concentraciones⁹. También ha sido utilizada durante décadas para el tratamiento contra tripanosomosis y babesiosis⁵.

El objetivo del presente trabajo fue comprobar el efecto de diminacina *in vivo* como tratamiento anti-leishmaniásico en hámsteres, con miras a su empleo como alternativa terapéutica para el control y posible erradicación de la leishmaniosis en caninos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación. Se utilizaron 26 hámsteres (*Mesocricetus auratus*) de dos meses de edad, de ambos sexos, 60 g de peso, los cuales fueron divididos en cuatro lotes, dos lotes de 6 individuos cada uno y dos lotes de 7 individuos cada uno. Durante el tiempo que duró la experiencia se les administró agua y alimento *ad-libitum*, observándose diariamente la eventual presentación de lesiones de piel, modificaciones de condición corporal y/o cambios de comportamiento.

Las jaulas en las que fueron alojados los animales fueron ideadas y construidas por el grupo de investigación, teniendo en cuenta la necesidad de lograr contenedores transparentes para poder registrar a primera

vista lo que sucedía en su interior. Las jaulas poseían una tapa de fácil remoción, programada para impedir el ingreso de insectos hacia el interior pero dotadas de espacios libres para el pasaje de aire.

Teniendo en cuenta estas premisas se llevó a cabo la construcción de jaulas de 40 cm de largo x 30 cm de ancho y 30 cm de altura, paredes de vidrio de 4 mm de espesor con refuerzos de 6 mm en el borde superior, al cual se adhirió un burlete de caucho de 10 x 10 mm para el correcto encastre de la tapa. Las jaulas fueron selladas con adhesivo de siliconas. Las tapas fueron realizadas con bastidor de perfil ángulo de acero laminado de 3/4” x 1/8” y malla doble de hilo de acero galvanizado de 1 x 1 mm ajustada al bastidor mediante planchuelas de 1/2” x 1/8” y tornillos autoperforantes, sellada con adhesivo de siliconas en su perímetro.

El material usado como cama fue la viruta de madera blanca debido a que, comparada con otras similares, tiene una mayor absorción de la humedad, facilidad de remoción y baja producción de partículas de polvo nocivas para los animales. Las tareas de observación y limpieza de las jaulas se realizaron diariamente en horario vespertino. Este protocolo (N° 0037) fue avalado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE.

Inoculación. De acuerdo al tratamiento utilizado los animales se agruparon de la siguiente manera:

Lote 1 (n=7) inoculados con *L. chagasi*.

Lote 2 (n=6) tratados con diminacina.

Lote 3 (n=7) tratados con diminacina e inoculados con *L. chagasi*.

Lote 4 (n=6) controles.

Los animales de los lotes 1 y 3 fueron inoculados vía intraperitoneal (1 ml/animal) con un macerado de bazo extraído de un canino naturalmente infectado con *L. chagasi*, cuyo diagnóstico fue realizado mediante los métodos serológico y parasitológico directo. El inóculo se realizó mediante la maceración de una porción de bazo del canino parasitado con solución fisiológica en un mortero de vidrio esterilizado.

El producto se cargó en jeringas estériles de 5 ml acopladas a agujas 25/8. Muestras de bazo fueron enviadas a los laboratorios de Biología Molecular y de Inmunohistoquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, para confirmar (mediante PCR e inmunohistoquímica) la especie *L. chagasi*.

El tratamiento con diminacina fue proyectado para ser realizado en tres etapas, de manera tal que existieron dos animales que recibieron una sola dosis, otros dos que recibieron dos dosis y finalmente, dos animales que recibieron tres dosis, de cada uno de los lotes 2 (n=6) y 3 (n=6).

La diminacina fue administrada vía intramuscular profunda a dosis de 3,5 mg/kg peso. La primera dosis se administró 30 días post inoculación de los amastigotes de *L. chagasi* a todos los animales de los lotes 2 y 3; la segunda dosis se aplicó quince días después a cuatro animales de cada uno de los lotes 2 y 3. La tercera dosis

se inyectó a los 15 días siguientes, a dos animales de cada uno de dichos lotes.

Toma de muestras. Luego de transcurridos 70 días de la inoculación, se llevó a cabo la eutanasia de un animal testigo de los lotes 1 y 3 con pentobarbital sódico y difenilhidantoina sódica a una dosis de 0,3 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal. Para confirmar si los hámsteres se encontraban infectados, luego de la necropsia, se realizaron improntas de bazo que fueron fijadas con alcohol de 96°, coloreadas con Giemsa y observadas al microscopio óptico.

La eutanasia de los 24 animales restantes (cuatro lotes de 6 hámsteres cada uno) fué programada para ser efectuada en tres etapas, en grupos de ocho animales (dos de cada lote) cada 30 días luego de la primera aplicación de diminacina. Luego de cada eutanasia fue realizada la necropsia del animal mediante la técnica convencional. Los órganos enteros (cerebro, corazón, pulmones, bazo, hígado, estómago, intestinos, genitales, riñones y piel) fueron inmediatamente fijados en formol bufferado al 10%, durante 48 horas.

Procesamiento de las muestras. Cada uno de los órganos fue procesado acorde a la técnica clásica de inclusión en parafina, previa deshidratación en alcoholes crecientes y pasaje por xilol, realizándose cortes de 5 μm con micrótopo tipo Minot; posteriormente fueron secados en estufa a 35°C durante 24 horas y coloreados con hematoxilina y eosina como técnica de rutina para identificar lesiones histopatológicas. Los experimentos se realizaron siguiendo las guías institucionales sobre el manejo y cuidado de animales de laboratorio establecidas internacionalmente.

RESULTADOS

La microscopía óptica permitió visualizar amastigotes de *L. chagasi* de localización extra e intracelular (citoplasma de macrófagos). Cada amastigote se identificó por la existencia de dos estructuras basófilas

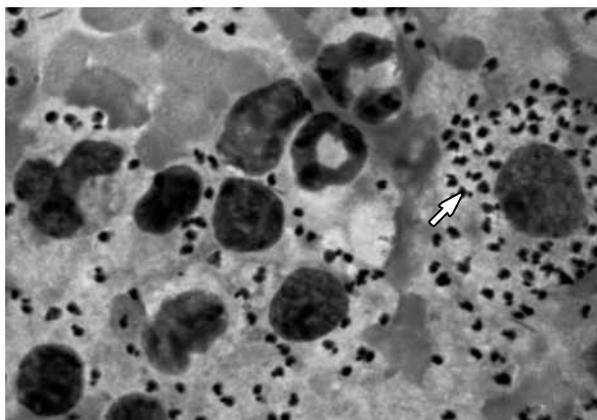


Figura 1. Estructuras compatibles con amastigotes de *L. chagasi* (flecha) extra e intracelulares (dentro de macrófagos). Impronta de bazo de un hámster del lote 1. Giemsa 100x.

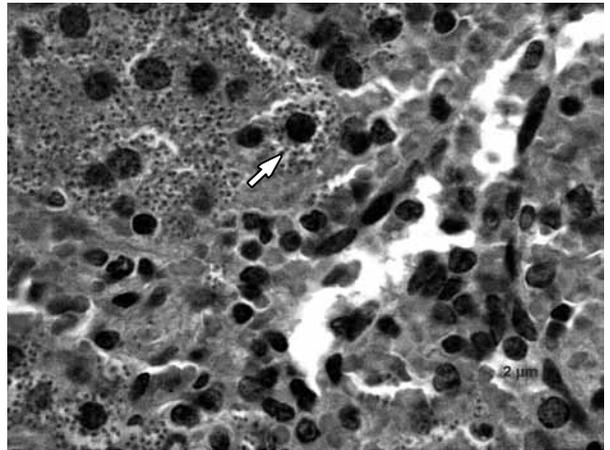


Figura 2. Bazo de hámster con macrófagos cargados de amastigotes de *L. chagasi* (flecha). HE 100x.

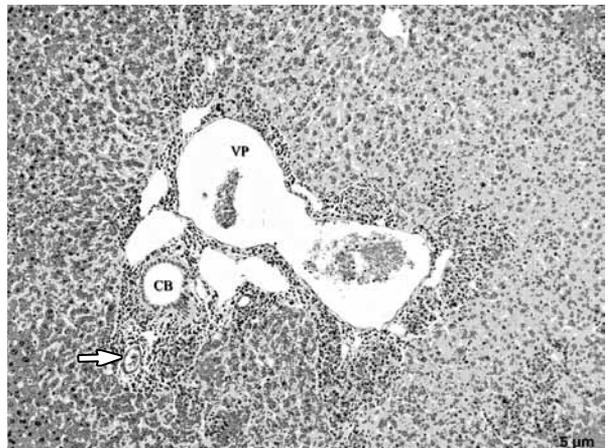


Figura 3. Hígado de hámster. Espacio porta rodeado de infiltrado linfoplasmocitario. CB: conducto biliar. VP: vena porta. Flecha: arteria hepática. HE 10x.

esféricas, una de mayor tamaño que la otra (núcleo y kinetoplasto del parásito), rodeadas por citoplasma claro de 2-5 μm de diámetro (Figura 1).

En el examen macroscópico de los órganos de los animales de los lotes 1 y 3 inoculados con el parásito se verificó hepato y esplenomegalia. En el bazo, el examen histopatológico evidenció múltiples focos de infiltrado linfoplasmocitario y abundantes macrófagos cargados con amastigotes de *L. chagasi* (Figura 2). En hígado se observó infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario localizado principalmente en la zona periportal (Figura 3), así como también acúmulos de histiocitos con amastigotes del parásito (Figura 4). Los riñones presentaron congestión de la zona medular y pequeños focos de infiltrado inflamatorio linfocitario intersticial en la corteza.

Las lesiones histopatológicas mencionadas fueron halladas en los animales de los lotes 1 (inoculados con *L. chagasi*) y 3 (inoculados con *L. chagasi* y tratados con diminacina). La diferencia entre ambos lotes fue que los roedores medicados presentaron menor sintomatología y mejor estado general, evidenciado por el normal estado del manto piloso, buena condición

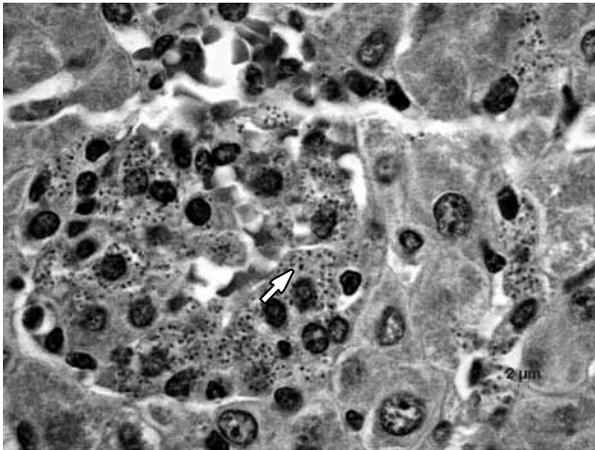


Figura 4. Hígado de hámster. Macrófagos con amastigotes de *L. chagasi* (flecha). HE 100x.



Figura 5. Hámster con lesión ulcero-costrosa en la nariz.

corporal, mantenimiento de los hábitos alimenticios y conducta normal. En contraste, los animales que fueron inoculados con *L. chagasi* sin diminacina, revelaron progresiva pérdida del estado corporal, adelgazamiento, debilidad, desprendimiento de pelo y (en un individuo) lesiones ulcero-costrosas en la región nasal (Figura 5).

Tanto en los animales tratados como en los no tratados con diminacina, no hubo diferencias en la carga parasitaria de los macrófagos en los diferentes órganos y tejidos estudiados.

DISCUSIÓN

Si bien existe un acotado número de drogas leishmanicidas en el mercado, las mismas son de uso humano y no están permitidas para el tratamiento de caninos debido al riesgo que existe en generar resistencia del parásito a las mismas. Hasta el momento, los trabajos realizados con diminacina abordaron aspectos de la leishmaniosis cutánea, siendo ensayos *in vitro* en su mayoría. Escasas investigaciones fueron realizadas *in vivo* abarcando aspectos de la leishmaniosis visceral¹⁴.

La eficacia de la diminacina como antileishmaniasico ya había sido demostrada *in vitro* a través de cultivos celulares⁹. En el presente trabajo se hizo lo propio empleando animales de laboratorio, aplicando la dosis recomendada por el laboratorio. Tanto el lote tratado con diminacina como el control inoculado con *L. chagasi* presentaron amastigotes en las impronta de bazo y en los cortes histopatológicos de los órganos estudiados, independientemente del tiempo transcurrido desde la inducción de la infección experimental. La circunstancia que los animales inoculados y tratados con diminacina mantuvieran clínicamente un buen estado de salud, podría sugerir que la droga generó un efecto benéfico en el organismo.

Se debería seguir investigando la potencialidad de esta droga, recurriendo a otros protocolos de tiempo y dosis mayores, e incluso incorporando combinaciones con coadyuvantes con efectos sinérgicos o potenciadores de la diminacina. En tal sentido, investigadores brasileños obtuvieron resultados alentadores inoculando ratones con *L. donovani* y tratándolos con una combinación de diminacina y artesunate, droga esta última utilizada para casos de malaria.

Por último, se comprobó que una pequeña porción de tejido esplénico extraído de un canino naturalmente infectado con *L. chagasi* se reveló como un inóculo efectivo para reproducir la enfermedad, además de que la utilización del hámster como modelo experimental resultó satisfactoria, pues respondió adecuadamente al inóculo, lográndose razonable carga parasitaria en la totalidad de los animales experimentalmente infectados.

Agradecimiento: Al Dr. Edgardo Borda, Director del Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales de la UNNE, por haber permitido llevar a cabo la experiencia en el bioterio de dicha institución.

REFERENCIAS

1. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. 2002. Canine leishmaniasis. *Adv Parasit* 57: 1-88.
2. Ashford RW. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.
3. Desjeux P. 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 14: 417-423.
4. Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microb & Infect Dis* 27: 305-318.
5. Fussgänger R, Bauer F. 1962. *Berenil, a new chemotherapeutic agent in veterinary medicine: data from Chemotherapeutic and Parasitological Laboratory of Farbwerke Hoechst*. On line: <http://www.jsava.co.za/index.php/jsava/article/viewFile/513/492>.
6. Killick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin Dermatol* 17: 279-289.
7. Koutinas A, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki K. 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece:

- A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Ass Hosp Anim* 35: 376-383.
8. **Leishman WB.** 1903. On the possibility of occurrence of tripanosomiasis in India. *Br Med J* 30: 1252.
 9. **Macharia JC, Bourdichon AJ, Gicheru MM.** 2004. Efficacy of trypan®: a diminazene based drug as anti-leishmanial agent. *Acta Trop* 92: 267-272.
 10. **Melby PC, Yang Y, Cheng J, Zhao W.** 1998. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 66: 18-27.
 11. **Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL.** 1998. Cloning of syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 2135-2142.
 12. **Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE.** 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 response. *J Immunol* 166: 1912-1920.
 13. **Miró G, Fraile C.** 1999. Leishmaniosis canina: revisión práctica. *Rev Consult Dif Vet* 7: 63-74.
 14. **Mutiso JM, Macharia JC, Barasa M, Taracha E, Bourdichon J, Gicheru MM.** 2011. *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial efficacy of a combination therapy of diminazene and artesunate against *Leishmania donovani* in Balb/C mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53: 129-132.