

LEISHMANIASIS

ESTUDIOS IN VITRO DE CRECIMIENTO Y SENSIBILIDAD A DROGAS

S. MARTINEZ, D. L. LOOKER, J. J. MARR

Utilizando un método sencillo previamente desarrollado en nuestro laboratorio, hemos logrado infectar una línea celular continua de macrófagos humanos U937 con promastigotes de dos cepas de *Leishmania braziliensis braziliensis* aisladas en Colombia. Estas cepas fueron además analizadas con pruebas de sensibilidad a Pentostam, allopurinol y allopurinol-ribósido. Este nuevo sistema será de mucha utilidad en varios aspectos relacionados con la enfermedad y elimina de hecho las dificultades inherentes a otros sistemas *in vitro*.

INTRODUCCION

Los experimentos diseñados para estudiar leishmanias *in vitro* han sido siempre limitados por las dificultades en la preparación de las células huéspedes, de los parásitos o de ambos, especialmente al aplicarlos al estudio de la acción de agentes quimioterapéuticos, la relación huésped-parásito y el metabolismo de los amastigotes de leishmanias. Los sistemas corrientemente disponibles usan macrófagos de exudado peritoneal (1, 2), la línea celular 503 de sarcoma canino (3, 4) células tumorales murinas P388D1 y J774 (5, 6) o macrófagos derivados de monocitos normales humanos (7,8). Todos ellos tienen limitaciones, en algunos casos porque las células no son de origen humano, en otros porque las poblaciones celulares no son uniformes o porque no es posible obtener cantidades suficientes de células. Así mismo, la mayoría de estos sistemas

celulares deben ser infectados con amastigotes provenientes de tejidos de animales infectados.

En los experimentos que aquí presentamos hemos utilizado promastigotes de leishmanias para infectar una línea celular continua de macrófagos humanos U937, la cual fue aislada por Sundstrom y Nilson en 1976 (9). Sobre la base de estudios citoquímico-enzimáticos, de microscopía electrónica y análisis de glicoproteínas de superficie, ha sido posible demostrar el origen monocítico de estas células (10-12). Las características que ellas presentan son las siguientes: capacidad fagocítica, receptores Fc para IgG, respuesta al factor inhibitorio de la migración, citotoxicidad anticuerpo dependiente y patrones enzimáticos similares a macrófagos humanos normales (13-17). Cuando las células U937 son estimuladas con linfoquinas desarrollan propiedades funcionales de macrófagos activados, tales como la producción de superóxido y las actividades microbicida y tumoricida (18-22). De la misma manera pueden ser activadas cuando son tratadas con myristato-acetato de phorbol, un activador de la protein-quinasa C que las transforma en células diferenciadas, adherentes y sin división (23).

Creemos que este es un sistema ideal para el crecimiento de leishmanias *in vitro* aplicable al estudio de sensibilidad a drogas, en el cual la célula huésped es de origen humano, similar a la de la infección natural. Así mismo, este método es susceptible a manipulación de laboratorio y muy reproducible por usar una línea celular continua, la cual proporciona grandes cantidades de células homogéneas que pueden ser directamente infectadas con promastigotes, eliminándose la necesidad de purificar amastigotes de tejidos animales. Es además ideal para ser aplicado a la clínica ya que los resultados pueden ser obtenidos en períodos relativamente cortos (8 días) comparados con

Dr. Samuel Martínez: Profesor Asociado. Departamento de Medicina Interna. División Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia; Dr. Douglas L. Looker: Profesor Instructor de Medicina; Dr. J. Joseph Marr: Profesor de Medicina y Bioquímica y Jefe de la División de Enfermedades Infecciosas; Department of Medicine, University of Colorado HSC, Denver, U.S.A.

Solicitud de separatas al Dr. Martínez.

los requeridos para el tratamiento de la enfermedad clínica (4 a 6 semanas).

MATERIAL Y METODOS

Cultivos: Las células U937 fueron mantenidas a 37°C como cultivo en suspensión en el medio de Iscove con suplemento de 10% suero fetal de ternera inactivado al calor (60°C por 30 minutos). Las transferencias de células se efectuaron cada 5 días a una concentración de 1×10^5 células/ml.

Los promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* (cepas 1010 y 2008) fueron aislados de pacientes colombianos y proporcionados amablemente por la Dra. Nancy Saravia (CIDEI-Colciencias, Cali, Colombia). Las cepas fueron mantenidas a 26° C en el medio de Hosmen (24) con suplemento de 10% suero fetal de ternera. Los pasajes se efectuaron cada 7 días comenzando con una concentración de 1×10^6 parásitos/ml.

Estudio de crecimiento: 1×10^6 células U937 fueron colocadas en frascos de plástico de 25 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo al cual se añadieron 10 nanogramos/ml de PMA. Después de dos días las células se diferenciaron formando una superficie celular única, adherente y sin división celular. En este estadio las células fueron infectadas con 2.5×10^7 promastigotes de las cepas de leishmania mencionadas, las cuales se encontraban en fase estacionaria de crecimiento. La relación final parásito/huésped fue de 25 a 1. Los frascos fueron incubados por dos horas a 34°C, después de lo cual fueron lavados tres veces con 10 ml de solución de Hans para remover los promastigotes libres. Las células infectadas fueron mantenidas a 34°C en 10 ml de medio de cultivo el cual fue renovado cada 2 días por un período de 8 días.

Para determinar el crecimiento de los parásitos en las células infectadas, éstas fueron fijadas y teñidas con la tinción diferencial de Dif-Quick. Los fondos de los frascos donde se encontraba la capa de células fueron cortados con una espátula de metal caliente. Usando el objetivo de inmersión en aceite se estudiaron consecutivamente 100 células y se determinó el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes y promastigotes por célula

huésped. Este procedimiento se realizó cada dos días durante el período de 8 días. Los experimentos de crecimiento fueron realizados por triplicado.

Pruebas de sensibilidad: Se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para el estudio de crecimiento, pero cambiando el medio de cultivo normal por otro conteniendo diferentes drogas, a partir del segundo día después de la infección. Se usaron dos drogas análogas de inosina: allopurinol y allopurinol-ribósido. Las concentraciones en el medio de cultivo fueron de 10, 5, 1, 0.5 y 0.1 microgramos/ml para cada una. Estos compuestos son de uso experimental y conocidos por su actividad contra *Leishmania aonovani* en otros sistemas *in vitro*. También se usó stibogluconato de sodio (Pentostam) a concentraciones de 50, 10, 5, 1 y 0.5 nanogramos/ml; esta droga es comúnmente usada para tratar la enfermedad clínica. Cada concentración de droga fue estudiada en triplicado. El procedimiento de conteo fue también igual al descrito para las pruebas de crecimiento.

RESULTADOS

El crecimiento de amastigotes en las cepas 1010 y 2008 de *Leishmania braziliensis braziliensis* en las células U397 se muestra en la tabla 1. Dos días después de la infección, los porcentajes de células infectada fueron de 76% y 85% respectivamente. Estos porcentajes se incrementaron a 90% o más a los 8 días de incubación. Al segundo día después de la infección más del 95% de los promastigotes se transformaron en amastigotes intracelulares. El número total de amastigotes por célula huésped se incrementó diariamente durante los 8 días de la prueba, llegando a alcanzar valores promedio de 22 y 28 parásitos por célula en las cepas 1010 y 2008 respectivamente. En contraste, el número de promastigotes disminuyó rápidamente. Las curvas de crecimiento de estas dos cepas se ilustra gráficamente en la figura 1. La figura 2 muestra una microfotografía tomada en microscopio de luz de una típica célula U937 infectada por numerosos amastigotes intracelulares.

En la figura 3 se muestra la curva de inhibición del crecimiento de amastigotes por el

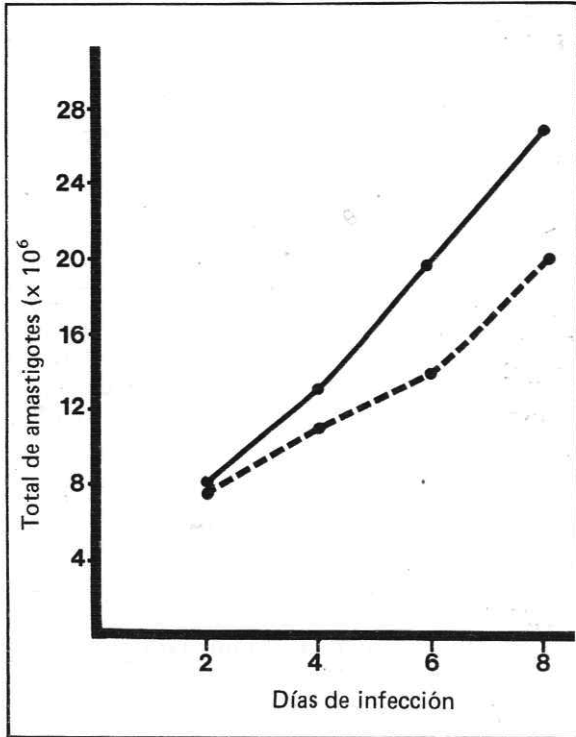


Figura 1. Curva de crecimiento de los cultivos de células U937 infectadas con *Leishmania braziliensis braziliensis*, cepas 1010 (-----) y 2008 (—).

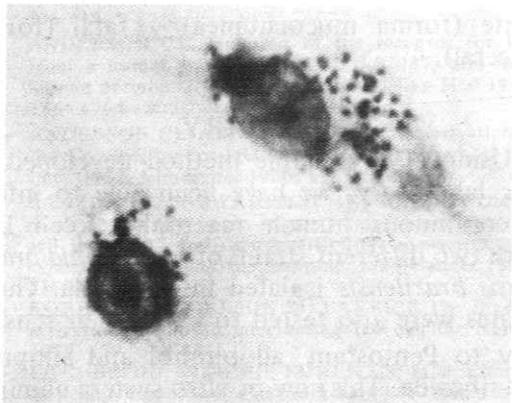


Figura 2. Infección típica de las células U937 por numerosos amastigotes intracelulares. Tinción diferencial de Dif-Quick. Aumento 100 X.

Pentostam. La dosis requerida para inhibir 50% del crecimiento del parásito, dosis efectiva 50 (DE50), fue de 25 nanogramos/ml para ambas cepas. Las DE50 para el allopurinol y allopurinol-ribosido en la cepa 2008 fueron de 2 y 1 microgramo/ml, respectivamente (Figura 4).

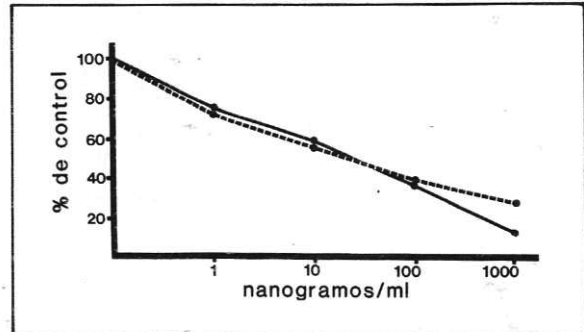


Figura 3. Curva de inhibición del crecimiento de las cepas 1010 (—) y 2008 (---) por el stibogluconato de sodio.

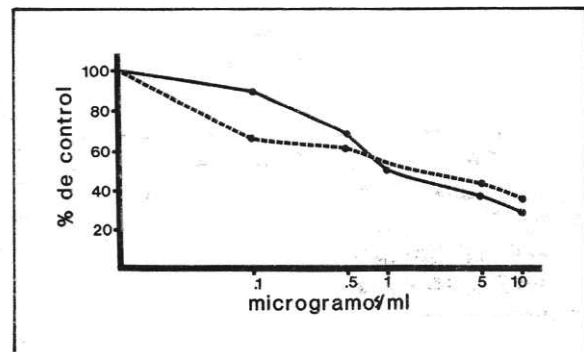


Figura 4. Curva de inhibición del crecimiento de la cepa 2008 por allopurinol (---) y allopurinol ribosido (—).

DISCUSION

Como se demuestra en la tabla 1 y en la figura 1, la línea celular de macrófagos humanos U937 se infecta fácilmente por los promastigotes de leishmania, los cuales se diferencian rápidamente en amastigotes. Estos amastigotes se replican intracelularmente alcanzando niveles adecuados para el estudio de crecimiento de dicho parásito. Como hemos comunicado previamente (25), este método de crecimiento puede ser aplicado al estudio del metabolismo y de la sensibilidad del parásito a las drogas.

El uso de una línea celular de macrófagos humanos tiene una serie de ventajas sobre otros métodos reportados. Ningún otro sistema experimental, exceptuando las líneas celulares murinas P388D1 y J774 (5, 6), permite el crecimiento de amastigotes en cantidades suficientes para este tipo de estudios. Las células murinas mencionadas tienen la desventaja de que sus reacciones metabólicas son

Tabla 1. Crecimiento de amastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* (cepas 1010 y 2008) en las células U937.

Días de infección	Porcentaje de células infectadas		Amastigotes por célula		Promastigotes por célula		Porcentaje de amastigotes		Amastigotes totales x 10 ⁶	
	1010	2008	1010	2008	1010	2008	1010	2008	1010	2008
2	76	85	10	9	0.2	0.4	97	96	8	8
4	82	90	13	15	0.1	0.2	99	98	11	13
6	86	92	16	22	0	0	100	100	14	20
8	90	96	22	28	0	0	100	100	20	27

diferentes a las de las células humanas; tal es el caso del metabolismo de la 9-deazainosina, el cual es diferente en células L de ratón (26) comparadas con células humanas (25).

Los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana, pese a que pueden ser infectados con promastigotes de leishmania, no proporcionan un número suficiente de parásitos que pueda ser utilizado en estudios metabólicos. El crecimiento del parásito en estos macrófagos es más lento y en menor número en comparación con la línea U937 (25) y además está sujeto a las variaciones inherentes a los distintos individuos que donan los monocitos.

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad a drogas (DE50), tales como la del Pentostam, fueron comparables a los obtenidos en otros sistemas (27-29). Es interesante anotar que aunque la cepa 2008 mostró una proporción de crecimiento mayor a la de la cepa 1010, la respuesta al Pentostam fue idéntica para ambas. Esto indica que la actividad de la droga es independiente del crecimiento del parásito. Así mismo, sabemos que la cepa 1010 fue obtenida de un paciente con leishmaniasis cutánea el cual no respondió a sucesivos tratamientos con Pentostam. El hecho de que su sensibilidad *in vitro* a esta droga sea igual a la de la cepa 2008 sugiere la posibilidad de que otros factores inherentes al huésped más que al parásito puedan jugar un papel importante en esta respuesta terapéutica.

Para la prueba de sensibilidad al allopurinol y allopurinol-ribosido se escogió la cepa 2008 debido a su mayor crecimiento. Las DE50 de 2 y 1 microgramos/ml respectivamente fueron similares a las que se han comunicado en otros sistemas (27-29).

Los experimentos descritos en este artículo fueron hechos usando promastigotes de leishmania en fase estacionaria de crecimiento. Esta es una condición indispensable para que el sistema funcione, y ha sido también comunicado por otros investigadores (30-33).

Estamos realizando actualmente nuevos experimentos tratando de utilizar el método propuesto, tanto para el crecimiento de otras especies de leishmania, como para el estudio de sensibilidad a otros agentes quimioterapéuticos, solos o en combinación. Creemos que este tipo de investigación será eventualmente de gran utilidad en el manejo clínico de las enfermedades leishmaniásicas con sus variantes severamente crónica (forma cutánea), desfigurante (forma mucocutánea) y fatal (forma visceral).

SUMMARY

Using a very simple method developed in our laboratory, we have been able to infect a continuous human macrophage cell line with two different strains of *Leishmania braziliensis braziliensis* isolated in Colombia. These strains were also tested to know their sensitivity to Pentostam, allopurinol and allopurinol-riboside. This new *in vitro* system eliminates the inherent problems of other systems and should be useful for studies related to the clinical disease.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CHANG KP, DAWYER DM. *Leishmania donovani* hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. J Exp Méd 1978; 147: 515-530.
- 2.- AKIYAMA HJ, HAIGHT RD. Interaction of *Leishmania donovani* and hamster peritoneal macrophages. A phase contrast microscopical study. Am JTrop Med Hyg 1971; 20: 539-545.

- 3.- AKIYAMA HJ, TAYLOR JC. Effect of macrophage engulfment and temperature on the transformation process of *Leishmania donovani*. Am J Trop Med Hyg 1970; 19: 747-754.
- 4.- AKIYAMA HJ, MCQUILLEN NK. Interaction and transformation of *Leishmania donovani* within *in vitro* cultured cells. An electron microscopical study. Am J Trop Med Hyg 1972; 21: 873-879.
- 5.- BERENS RL, MARR JJ. Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in a continuous macrophage-like culture. J Protozool 1979; 26: 453-456.
- 6.- CHANG KP. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. Science 1980; 209: 1240-1242.
- 7.- BERMAN JD, DWYER DM, WYLER DJ. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages *in vitro*. Infect Immun 1979; 26: 375-379.
- 8.- PEARSON RD, HARCUS JL, SYMES PH, et al. Failure of the phagocytic oxidative response to protect human monocyte-derived macrophages from infection by *Leishmania donovani*. J Immunol 1982; 129: 1282-1286.
- 9.- SUNDSTROM C, NILSSON K. Establishment- and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int J Cancer 1976; 17: 565-577.
- 10.- HUBER CH, SUNDSTROM C, NILSSON K, et al. Surface receptors on human hematopoietic cell lines. Clin Exp Immunol 1976; 25: 367-376.
- 11.- EPSTEIN AL, LEVY R, KIM H, et al. Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines. Cancer 1978; 42: 2379-2397.
- 12.- ANDERSON LC, GAHMBERG CG, NILSSON K, et al. Surface glycoprotein patterns of normal and malignant human lymphoid cells. I. T cells, T blasts, and leukemic T cell lines. Int J Cancer 1977; 20: 702-707.
- 13.- KOREN HS, FISCHER DG, PIKE MC, et al. U937 cell line: a new model for study of human monocytes. En: FOSTER O, LANDY M, eds. Heterogeneity of mononuclear phagocytes. London: Academic Press; 1981: 406-413.
- 14.- ANDERSON CL. Isolation of the receptor for IgG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. J Exp Med 1982; 156: 1794-1805.
- 15.- ANDERSON CL, ABRAHAM GN. Characterization of the Fc receptor for IgG on a human macrophage cell line, U937. J Immunol 1980; 125: 2735-2741.
- 16.- RADZUN HJ, PARWARESCH MR, SUNDSTROM C, et al. Monocytic origin of the human hematopoietic cell line U937 and its convertibility to macrophages evidenced by isoenzyme mapping. Int J Cancer 1983; 31: 181-186.
- 17.- KOREN HS, ANDERSON SJ, LARRICK JW. *in vitro* activation of a human macrophage-like cell line. Nature 1979; 179: 328-331.
- 18.- FISCHER DG, PIKE MC, KOREN HS, et al. Chemotactically responsive and nonresponsive forms of a continuous human monocyte cell line. J Immunol 1980; 125: 463-465.
- 19.- LARRICK JW, FISCHER DG, ANDERSON SJ, et al. Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated *in vitro*: a model of macrophage functions. J Immunol 1980; 125: 6-12.
- 20.- WING EJ, KOREN HS, FISCHER DG, et al. Stimulation of a human macrophage-like cell line (U937) to inhibit multiplication of an intracellular pathogen. J Reticuloendothel Soc 1981; 29: 321-328.
- 21.- CLEMENT LT, LEHMEYER JE. Regulation of the growth and differentiation of a human monocytic cell line by lymphokines. I. Induction of superoxide anion production and chemiluminescence. J Immunol 1983; 130: 2763-2766.
- 22.- WHARTON W. Human macrophage-like cell line U937-1 elaborates mitogenic activity for fibroblasts. J Reticuloendothel Soc 1983; 33: 151-156.
- 23.- HARRIS P, RALPH P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. J Leukocyte Biol 1985; 37: 407-422.
- 24.- BERENS RL, MARR JJ. An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. J Parasitol 1978; 64: 160.
- 25.- LOOKER DL, MARTINEZ S, HORTON J, et al. Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in the continuous human macrophage cell line U937: studies of drug efficacy and metabolism. J Infect Dis 1986; 154: 324-327.
- 26.- LAFON SW, NELSON DJ, BERENS RL, et al. Inosine analogs: their metabolism in mouse L cells and in *Leishmania donovani*. J Biol Chem 1985; 260: 9600-9605.
- 27.- BERENS RL, MARR JJ, NELSON DJ, et al. Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol ribonucleoside on intracellular forms of *Leishmania donovani*. Biochem Pharmacol 1980; 29: 2397-2398.
- 28.- NELSON DJ, LAFON SW, TUTTLE JV, et al. Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. Biological effects, metabolism, and enzyme phosphorylation. J Biol Chem 1979; 254: 11544-11549.
- 29.- BERMAN JD, LEE LS, ROBINS RK, et al. Activity of purine analogs against *Leishmania tropica* within human macrophages *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24: 233-236.
- 30.- GIANNINI MS. Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani*. J Protozool 1974; 21: 521-527.
- 31.- KEITHLY JS. Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamsters. J Protozool 1976; 23: 244-245.
- 32.- DORAN TI, HERMAN R. Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. J Protozool 1981; 28: 345-350.
- 33.- SACKS DL, PERKINS PV. Identification of an infective stage of leishmaniasis promastigotes. Science 1984; 223: 14179-1419.