

99
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE Leishmania
CON LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ
EXTRACELULAR DE LA PIEL DEL HUESPED,
Y EVENTOS INICIALES DE LA INFECCION
DE MACROFAGOS.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARIA ROSALIA LIRA CARMONA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

1. LISTA DE ABREVIATURAS

2. RESUMEN

3. INTRODUCCION

I ASPECTOS GENERALES DE LA LEISHMANIASIS1

Epidemiología

Posición taxonómica.

Biología de Leishmania.

Biología celular.

Ciclo de vida.

1) Reconocimiento y unión entre promastigotes y macrófagos.

2) Endocitosis de Leishmania por el macrófago.

3) Sobrevivencia intracelular del parásito.

4) Diferenciación y división celular.

II SUPERFICIE CELULAR DE PARASITO.....10

A) Carga superficial.

B) Lectinas.

III TIPOS DE LEISHMANIASIS.....14

Aspectos patológicos de la Leishmaniasis cutánea.

IV MATRIZ EXTRACELULAR.....18

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....22

5. OBJETIVOS.....26

6. MATERIALES Y METODOS.....27

I Caracterización de los parásitos.....27

1. Parásitos.

2. Infección "in vivo" en animales de laboratorio.

Infección en hámsteres

Infección en ratones BALB/c

3. Pruebas de aglutinación con lectinas.

4. Carga de superficie.

II Interacciones parásito-macrófago "in vitro".....31

1. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón.
2. Interacción de leishmanias con macrófagos peritoneales de ratón.
3. Interacción parásito-macrófago, marcaje de antígenos de Leishmania con Concanavalina A conjugada con FITC.
4. Marcaje de antígenos de Leishmania con anticuerpos antileishmania.
 - A. Inmunización de ratones.
 - B. Reacción de suero antileishmania con los parásitos.
 - C. Interacción parásito-macrófago, inmunofluorescencia indirecta.

III Matriz extracelular y parásitos.....34

1. Histoquímica de piel de ratón.
2. Obtención de colágena tipo I de tendón de cola de rata.
3. Interacción de cortes de piel de ratón con L. mexicana.
 - A) Tinción con azul alciano 1%.
 - B) Tinción con safranina, para cuantificación indirecta de mucopolisacáridos.
4. Interacción de Leishmania con geles de colágena I, como sustrato.
 - A) Preparación de geles de colágena I.
 - B) Interacción de Leishmania con geles de colágena.
 - C) Procedimiento de tinción con rojo sirio.
 - D) Ensayos de interacción con geles de colágena preparados
 - E) Ensayos de interacción con geles de colágena I.
 - F) Interacción de parásitos con geles de colágena en ausencia y presencia de suero fetal bovino.

7. RESULTADOS.....42

1. Caracterización de los parásitos
 2. Infección "in vivo" en animales experimentales
 3. Interacción parásito-macrófago "in vivo"
 4. Pruebas de aglutinación con lectinas
 - Tabla 1.....46
 5. Movilidad electroforética
 - Tabla 2.....48
- II Interacciones parásito-macrófago "in vitro".....48
1. Infección de macrófagos peritoneales de ratón con L. mexicana
 2. Interacción parásito-macrófago, marcaje de antígenos de superficie con Con A-FITC
 3. Interacción Leishmania-macrofago, utilización del suero antileishmania como marcador de antígenos de superficie del parásito.

III Matriz extracelular y parásitos.....53

1. Interacción de L. m. pifanoi con secciones de piel de ratón

A) Determinación cualitativa de GAGs en cortes de piel de ratón. Tinción con azul alciano.	
B) Determinación cuantitativa de GAGs. Microespectrofotometría con Safranina O.	
GRAFICA 1	
TABLA 3.....	54
2. Interacción de promastigotes de <u>L. mexicana</u> con geles de colágena I	
GRAFICA 2 Y 3	
TABLA 4.....	60
TABLA 5.....	61
Interacción de <u>L. m. pifanoi</u> con colágena I, utilizando medio de cultivo con y sin suero fetal bovino.	
TABLA 6.....	63
FIGURAS.....	65
8. DISCUSION.....	72
9. CONCLUSIONES.....	85
APENDICE A.....	87
10. BIBLIOGRAFIA.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti IgG	Anticuerpos anti-inmunoglobulinas
b	ordenada al origen
C3	Complemento tipo 3
D	Daltones
Fc	Fracción cristalina de la inmunoglobulina
FE	Factor de excreción
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAGs	Glicosaminoglicanos.
gp63	glicoproteína de 63 Kilodaltones
IgG	Inmunoglobulinas
Kd	Kilodalton
L.	<u>Leishmania</u>
MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
M199	Medio 199
mM	milimolar
M	Molar
m.e.	movilidad electrofóretica
µm	micrómetro
µl	microlitro
m	pendiente
nm	nanómetro
p.e.	por ejemplo
SFB	Suero fetal bovino
X	veces ó cambios
v/v	volumen por volumen

RESUMEN

Las Leishmaniasis son enfermedades humanas que actualmente ocasionan grandes problemas de salud pública. En el huésped vertebrado el parásito se desarrolla dentro de los macrófagos. Los mecanismos que le permiten a Leishmania parasitar los fagocitos humanos, los cuales están altamente capacitados para endocitar y destruir microorganismos, son desconocidos.

El propósito de la presente investigación, fue contribuir al estudio de los eventos iniciales de la infección entre macrófagos y leishmanias, que posiblemente sean críticos en el establecimiento de esta enfermedad.

Con la finalidad de determinar si los promastigotes de Leishmania se asociaban con componentes de matriz extracelular, se realizaron incubaciones "in vitro" de promastigotes con secciones de piel de ratón. Utilizando el azul alciano, un colorante específico de GAGs (componentes de la matriz extracelular de la piel), obtuvimos una indicación cualitativa de que éstos estaban siendo removidos. Por otro lado, mediante el uso de la safranina O y un método microespectrofotométrico (para cuantificar GAGs), observamos una reducción de cerca del 50% de concentración de colorante a las 3 y 6 hrs., respecto a una muestra control de tejido normal, la cual se incrementó hasta en un 80% en las interacciones de 48 hrs. Se utilizaron matrices de colágena I incubadas con Leishmania, para observar si el parásito degradaba este componente. Midiendo indirectamente la concentración de la colágena con rojo sirio, obtuvimos una degradación de hasta 1 µg por gel.

Se conoce que ciertos componentes de la matriz extracelular pueden influir en procesos celulares de otros sistemas. Para conocer si la colágena inducía la diferenciación extracelular de los promastigotes, después de

realizar interacciones de éstos con matrices de colágena I, se hicieron determinaciones de movilidad electrofóretica, que mostraron un incremento en la carga superficial negativa de los promastigotes, lo cual sugiere un cambio en las propiedades de superficie de los mismos.

Para determinar cambios antigénicos en la superficie de los parásitos durante la infección "in vitro" de macrófagos peritoneales, se hizo un seguimiento de éstos, marcándolos con anticuerpos policlonales, desde 2 hasta 48 hrs de infección. Durante este tiempo, los antígenos del parásito no sufrieron ninguna alteración evidente, lo que indicó que posiblemente otros factores estén involucrados en la sobrevivencia y diferenciación de los parásitos.

INTRODUCCION.

Existen varias especies de protozoarios parásitos de la familia Trypanosomatidae, de importancia médica y biológica por ser organismos patógenos del hombre y otros vertebrados. Estos parásitos producen enfermedades denominadas exóticas y son predominantes en regiones tropicales y subtropicales del mundo, como la enfermedad de "Chagas" producida por Trypanosoma cruzi y las Leishmaniasis (24).

I. Aspectos generales de la Leishmaniasis.

Epidemiología.

Las Leishmaniasis son enfermedades producidas por protozoarios del género Leishmania, que se han descrito en cerca de 74 países de todos los continentes, excepto en Australia (24). Esta enfermedad afecta a 12 millones de individuos en Africa, Asia y Latinoamérica, produciendo 5000 muertes y 4000 casos nuevos reportados cada año (26,57).

Posición taxonómica.

El género Leishmania se encuentra clasificado dentro del siguiente grupo taxonómico, de acuerdo a Levine y cols. 1980 (58):

Subreino:	Protozoa	
Phylum:	Sarcomastigophora	Honigberg y Balamuth, 1963
Subphylum:	Mastigophora	Diesing, 1866
Clase:	Zoomastigophorea	Calkins, 1909
Orden:	Kinetoplastida	Honigberg, 1963; Vickerman, 1976

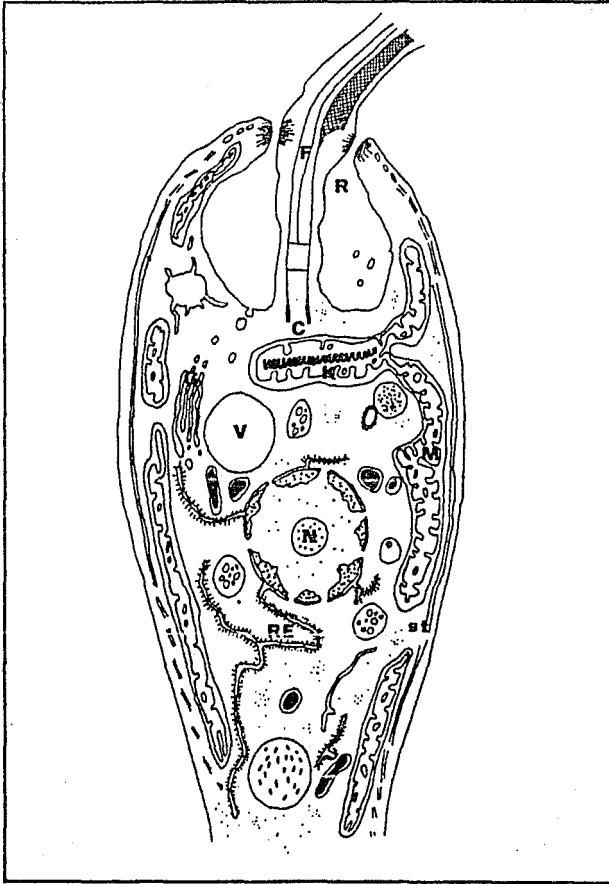
Suborden: Tripanosomatina Kent, 1880
Familia: Trypanosomatidae Doflein, 1901; Grobben, 1905
Género: Leishmania Ross, 1903.

Biología de Leishmania.

Durante su ciclo de vida, las leishmanias se desarrollan en dos formas estructural y fisiológicamente distintas: el promastigote y el amastigote. El promastigote se caracteriza por ser un organismo unicelular flagelado en forma de huso y con dimensiones variables (de 10 a 15 μ m de longitud y de 1.5 a 3.4 μ m de diámetro), que vive extracelularmente en el sistema digestivo del vector invertebrado (insecto del género Phlebotomus en el viejo mundo, ó Lutzomyia en el Nuevo Mundo) y es la forma común cultivada en el laboratorio (61). El amastigote es de forma oval o redondeada (de 2 a 4 μ m de diámetro), posee un rudimento de flagelo confinado al reservorio flagelar y vive exclusivamente en el interior de los fagocitos mononucleares del sistema reticuloendotelial del huésped vertebrado (hombre u otro vertebrado) (24).

Biología Celular

Con diferencias menores, todas las especies de Leishmania tienen características morfológicas y ultraestructurales comunes. En general, se han descrito una gran variedad de organelos presentes en ambos estadios como: la membrana plasmática, un sistema microtubular con cuatro tipos funcionales de microtúbulos, reservorio flagelar, complejo mitocondria-cinetoplasto, cuerpo basal, aparato de Golgi, núcleo, nucleólo, retículo endoplasmático rugoso y liso, lisosomas y una gran cantidad de vacuolas (26).



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ULTRAESTRUCTURA
DE
LEISHMANIA

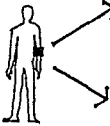
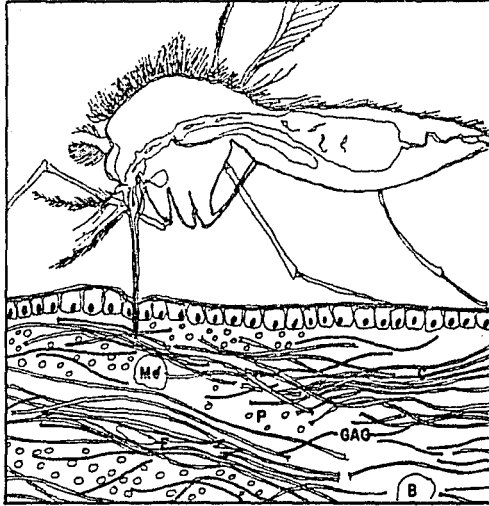
F= flagelo, G= Aparato de Golgi, K= cinetoplasto,
M= mitocondria, R= reservorio flagelar, N= núcleo,
RE= retículo endoplasmático, st= sistema microtubular,
V= vacuola.

Ciclo de Vida.

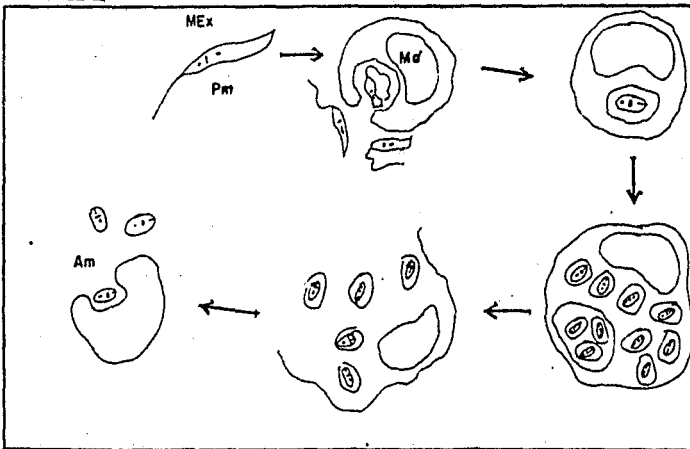
Los promastigotes son transmitidos por el insecto vector al ser inoculados subcutáneamente en la piel del huésped (hombre u otro vertebrado). Posteriormente son endocitados por los macrófagos que recurren a la dermis del huésped, y quedan alojados en el interior de vacuolas parasitóforas. Ahí pierden su flagelo, se diferencian en formas amastigotes y se multiplican por mitosis hasta provocar la lisis del macrófago. Los amastigotes son entonces liberados al medio extracelular donde pueden ser endocitados nuevamente por los fagocitos adyacentes (85).

Cuando un insecto se alimenta de un huésped infectado, ingiere junto con la sangre macrófagos parasitados y amastigotes libres, que se diferencian a promastigotes en el tracto digestivo del insecto (66), y comienzan a dividirse por fisión binaria. El parásito coloniza primero la parte posterior o media del intestino, se adhiere a las microvellosidades de las células epiteliales a través del flagelo y forma agregados. Finalmente los parásitos son expulsados junto con la saliva del insecto vector al succionar la sangre de otro vertebrado (26). En todos los casos las infecciones pueden ser transmitidas del hombre a una gran variedad de reservorios animales. Los reservorios del parásito en la naturaleza son: edentados, roedores y carnívoros (18,26).

Una de las características más relevantes en la Leishmaniasis, es la capacidad que tienen los parásitos para infectar y desarrollarse dentro de los macrófagos, que son células del sistema inmune celular del huésped. De las observaciones realizadas en infecciones "in vitro", se ha propuesto la existencia de varios eventos importantes durante esta etapa que son: 1) el reconocimiento y la interacción entre macrófagos y leishmanias, 2) el



CICLO DE LEISHMANIA



Am amastigotes, B Células cebadas, C colágena, F fibroblasto, GAG Glicosaminoglicanos, Md Macrófago, MEx Matriz Extracelular, P proteoglicanos, Pm promastigotes.

proceso de endocitosis del parásito por el macrófago, 3) la diferenciación y división de Leishmania y 4) la sobrevivencia intracelular (1,12,24,27).

1) Reconocimiento y unión entre promastigotes y macrófagos.

Cuando el parásito entra al huésped vertebrado no interacciona directamente con los fagocitos mononucleares, sino hasta después de un determinado tiempo, esto hace suponer que ambas células deban poseer algún mecanismo para atraerse. A pesar de que se ha sugerido que los promastigotes de L. mexicana (41), buscan activamente sus células huéspedes, se ha dado poco apoyo experimental a esta suposición. Tampoco se han encontrado evidencias de que los parásitos utilicen una vía quimiotáctica para atraer a los macrófagos.

Se sabe que la unión de materiales extraños a los macrófagos es mediada por fuerzas electrostáticas. Esta unión es potenciada si a tales materiales se les acoplan moléculas que son reconocidas por receptores localizados en la superficie del macrófago. Así por ejemplo, la proteína C3 del complemento y la fracción Fc del las inmunoglobulinas (IgG) reconocen receptores de la membrana del macrófago (19).

De estudios "in vitro" realizados con diferentes especies de Leishmania, la unión de promastigotes a macrófagos ocurre por lo menos mediante dos vías, una independiente de suero y otra que lo requiere (26,64).

En algunas especies de Leishmania la unión a macrófagos es potenciada a bajas concentraciones de suero (4%), obteniendo un incremento en ésta de hasta 5 veces respecto a los controles. Utilizando un anticuerpo monoclonal (anti C3b), se observó que las proteínas C3 del complemento se adherían a la superficie de los promastigotes, tanto en forma activa como inactiva. De

acuerdo a las anteriores observaciones se sugirió que los promastigotes se recubren con esta proteína y entonces son reconocidos por los receptores del macrófago para posteriormente ser endocitados (64).

En la unión independiente de suero Leishmania inicia sus interacciones con la célula huésped estableciendo contactos de sus superficies celulares a través de moléculas que funcionan como receptores de la membrana plasmática (12,26,27). Esta se produce entre ligandos específicos de la superficie del promastigote (glicoproteínas, glicolípidos o azúcares con terminales de sacáridos o ácido siálico) que se unen a receptores glicoproteicos del macrófago (por ejem. un receptor manosa-fucosa) (25).

Esto ha sido demostrado por la inhibición de la unión de leishmanias a macrófagos mediante ensayos de: unión competitiva de ligandos con lectinas (Con A, WGA, RCA); utilizando azúcares como: D-manosa, N-acetil glucosamina, D-glucosa, L-fucosa; ó por unión de ligandos con glicosidasas como la α manosidasa, α N-acetil-D-glucosaminidasa, β -glucosidasa (12).

Bray (1983) demostró que los promastigotes de L. m. mexicana se unen mediante un ligando semejante a la aglutinina de germen de trigo a un receptor que contiene un residuo de N-acetil glucosamina sobre la superficie del macrófago y que requiere de Ca^{++} y Mg^{++} para que ocurra la unión (12,25). Hasta el momento se desconoce si los amastigotes utilizan las mismas vías de unión que los promastigotes.

2) Endocitosis de Leishmania por el macrófago.

La unión parásito-fagocito es un prerequisite inicial para la endocitosis en la infección de macrófagos por promastigotes de L. mexicana. Blackwell & Alexander, 1983 sugieren que tanto el receptor C3b como el

receptor manosa-fucosa, que posiblemente median la unión, se necesitan para una endocitosis óptima de los promastigotes por los macrófagos (12).

La actividad fagocítica del macrófago es muy importante en este evento, debido a que el promastigote no aporta energía durante su internalización, y es estimulada probablemente por la compatibilidad de la superficie celular del parásito para la adhesión del mismo, y por la motilidad de los promastigotes que incrementan las oportunidades de contacto (26). El mecanismo motor para este proceso es proporcionado por la actina y miosina del citoesqueleto del macrófago. La incubación previa de macrófagos con citocalasina B, droga que inhibe la acción de los microfilamentos, reduce considerablemente la endocitosis de promastigotes por los macrófagos (5).

Aikawa (2), sugirió que los parásitos entran a la célula huésped por el extremo anterior, donde se localiza el flagelo. Otro autor (84), reportó también que los parásitos se unen a la célula huésped predominantemente por el flagelo. Sin embargo, por estudios posteriores se ha observado que el promastigote no es endocitado por el macrófago con una orientación específica, sino que se adhieren y entran a él en forma azarosa (3,23).

También se ha postulado que el parásito es introducido al interior del macrófago por un mecanismo de "fagocitosis facilitada" (12), que culmina con la localización del parásito en la vacuola parasitófora que se fusiona subsecuentemente con los lisosomas (6,27). Estos descargan su contenido enzimático dentro de las vacuolas, sin afectar importantemente a las leishmanias, ya que éstas continúan desarrollando su ciclo de vida intracelular (37).

3) Sobrevivencia intracelular del parásito.

La causa por la cual los parásitos son capaces de resistir los efectos del contenido enzimático de los lisosomas es desconocida. Algunos autores

(27,59) han tratado de explicar la sobrevivencia de los parásitos dentro de los macrófagos, sugiriendo varias hipótesis. Así por ejemplo, se ha propuesto que las glicoproteínas y polisacáridos de la membrana del parásito actúan como una barrera mecánica de protección.

Los promastigotes tienen la capacidad de secretar metabolitos de naturaleza aniónica denominados factores de excreción (FE)(48,66). Estas moléculas que son polisacáridos y glicoproteínas, ricas en carga negativa, posiblemente tienen un papel importante en la evasión de la respuesta inmune del huésped, proporcionándole de alguna forma protección al parásito contra las enzimas lisosomales. Su efecto podría ser la inhibición directa de las enzimas (7,38), o modificando el pH intralisosomal (21). Los estudios experimentales sólo han demostrado la inhibición de una de las enzimas, de cuatro ensayadas. En relación a los posibles cambios en el pH intralisosomal, se ha observado que las vacuolas parasitoforas se acidifican rápidamente durante la infección con Leishmania, lo cual también hace poco probable la validez de esta hipótesis (26).

Otro de los efectos que se han propuesto de los factores de excreción es que ellos influyen en el proceso de endocitosis del parásito por el macrófago, actuando como reguladores en la velocidad de penetración del parásito y permitiéndole su diferenciación (49).

No se conoce si la diferenciación es el evento principal que le confiere a Leishmania la capacidad para resistir los mecanismos de destrucción de la célula huésped sin embargo, se ha observado que los amastigotes son más infectivos a macrófagos que las formas promastigotes en infecciones "in vitro", lo que sugiere de alguna forma que posiblemente exista una diferenciación extracelular o previa a la endocitosis, hacia la forma amastigote.

3) Diferenciación y división celular.

La diferenciación intracelular de la forma promastigote a la amastigote, ocurre según estudios "in vitro", aproximadamente en 24 hrs después de ser endocitados (5,42,50). La diferenciación puede ser ocasionada o estimulada por un ambiente hostil, con el cual el parásito está en contacto una vez que ha sido endocitado. Se ha determinado que el inicio de esta diferenciación depende de un cambio en la temperatura (de 27 a 35°C) y de otros factores desconocidos (26). Se han observado diferencias antigénicas entre los dos estados de vida (43), así como cambios antigénicos durante su diferenciación (28). Los cambios ocurridos en la diferenciación no son sólo a nivel morfológico, sino que implican también cambios en las propiedades antigénicas, y en su metabolismo así como diferencias en la expresión de ciertos carbohidratos de superficie entre ambos estados. Además de las diferencias bioquímicas en su metabolismo (46), se ha observado un cambio drástico en la biosíntesis de tubulina durante la diferenciación de estado promastigote al amastigote (42).

Posteriormente los parásitos se multiplican por mitosis hasta provocar la lisis del macrófago y son liberados al medio extracelular donde pueden ser fagocitados nuevamente por las células adyacentes (85). Los eventos subsiguientes de la infección dependen de la especie involucrada.

II. Superficie celular del parásito.

Otro de los aspectos más sobresalientes de la Leishmaniasis es que los parásitos pueden desarrollarse dentro de los macrófagos. Estos fagocitos están especialmente equipados para destruir microorganismos invasores y

realizan funciones importantes en otros eventos de la inmunidad del huésped. Así, los macrófagos funcionan como la célula huésped del parásito y como célula reguladora o efectora de la respuesta inmune celular. El mantenimiento de éstas células en medios de cultivo después de ser extraídas de la cavidad peritoneal de ratones susceptibles a la infección, ha permitido el estudio experimental de las interacciones huésped-parásito (26,52).

La infección "in vitro" de macrófagos cultivados se ha utilizado para estudiar: mecanismos de infección a nivel celular y molecular, la actividad de destrucción del macrófago bajo la influencia de factores inanes y la eficiencia de los agentes quimioterapéuticos y la posibilidad de mantener y producir amastigotes "in vitro" (26).

El estudio de la superficie celular del parásito ha recibido especial atención, debido a que esta estructura recibe señales medioambientales importantes que pueden ser traducidas en cambios de la superficie celular y en el proceso de diferenciación del parásito (36).

Carga superficial.

La carga superficial de una célula eucariote está determinada por la naturaleza y el número de grupos iónicos sobre la membrana celular, así como por las propiedades del medio en el cual se encuentran (69). Estudios previos demostraron que la carga superficial negativa de una célula se debe a la presencia de grupos carboxilo, sulfato, fosfato y ácido sílico expuestos sobre la membrana (36).

Se conoce que los promastigotes de Leishmania poseen una carga superficial negativa neta (8,36,50). A pesar de que los grupos funcionales responsables de la carga superficial de Leishmania no han sido identificados, se

creo que el ácido siálico puede participar (36). La distribución uniforme de esta carga se demostró ultraestructuralmente en promastigotes y amastigotes de Leishmania utilizando fierro coloidal y ferritina catiónica (37).

Los amastigotes aislados de vertebrados infectados se diferencian en promastigotes cuando se transfieren a cultivos axénicos a 28°C. Los pasajes sucesivos de promastigotes en estos cultivos por largos períodos de tiempo disminuyen gradualmente su capacidad infectiva (52). Pimienta y cols. 1983, midieron la carga superficial neta de L. mexicana amazonensis por análisis de movilidad electroforética celular y observaron que los promastigotes presentan una carga superficial más negativa que los amastigotes, sin embargo, no encontró diferencias entre promastigotes cultivados por diferentes períodos de tiempo. Esta correlación ya se ha hecho en otros sistemas, donde la carga superficial cambia en función del estadio en el cual se encuentre la célula, por ejemplo, De Souza y cols. (34), observaron que existe un incremento en la carga negativa durante el desarrollo de formas epimastigotes a tripomastigotes de Trypanosoma cruzi.

Otros estudios han indicado que ocurren cambios en las propiedades de superficie celular en cepas de L. braziliensis que se han mantenido por largos períodos de tiempo en cultivo (8). Por un lado la aglutinina de Ricinus communis (RCA) aglutina promastigotes de 2 a 10 transferencias pero no a las de 500, y por otro la ferritina catiónica se une a promastigotes infectivos pero no a los no infectivos, lo que indica la posible pérdida de sitios aniónicos sobre su superficie celular (50). En otros parásitos como Entamoeba histolytica (79), se ha encontrado una correlación entre infectividad y carga de superficie celular.

Lectinas.

Los estudios de la superficie celular de promastigotes y amastigotes de Leishmania, han conducido a la conclusión de que existen moléculas ricas en carbohidratos, que son reconocidos específicamente por lectinas (36). Las lectinas son proteínas de origen animal o vegetal, que reconocen carbohidratos específicos, y que pueden aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados. Estas sustancias poseen por lo menos dos sitios de unión de carbohidratos, no tienen actividad enzimática, pueden ser solubles o estar unidas a la membrana plásmatica (31). Estas han sido empleadas para la detección, aislamiento y caracterización de carbohidratos que constituyen glicolípidos, polisacáridos y glicoproteínas del parásito (35).

Las lectinas representan una herramienta útil para investigar diferencias entre cepas de parásitos, así como los cambios que acompañan la diferenciación de los mismos. Como resultado de la interacción de las lectinas con moléculas de la membrana plasmática, se inducen una gran variedad de respuestas biológicas. Algunas de ellas como la Concanavalina A (Con A), la aglutinina de Ricinus communis (RCA) y la aglutinina de cacahuete (PNA) se han utilizado para caracterizar la superficie celular del parásito, durante la diferenciación y para distinguir formas patógenas de las no patógenas (48).

Dawidowicz y cols (33), sugirieron que ciertos problemas de clasificación podrían resolverse si la presencia de ciertos grupos de carbohidratos específicos pudiera ser demostrada y utilizada como criterio bioquímico para ayudar a la identificación de diferentes especies de Leishmania. Jacobson y cols. (31), exploraron la posibilidad de usar la aglutinación por lectinas para identificar y diferenciar cepas de Leishmania.

III. Tipos de Leishmaniasis.

Las especies y subespecies del género Leishmania patógenas del hombre son morfológicamente indistinguibles entre sí (66). Por eso para su clasificación se han utilizado diversos criterios: clínicos, epidemiológicos, histopatológicos y geográficos (22,56). De acuerdo a los criterios anteriores estos organismos han sido agrupados en 3 complejos que caracterizan 3 tipos principales de Leishmaniasis (66).

- 1) Visceral; producida por el complejo Leishmania donovani
- 2) Mucocutánea; producida por el complejo L. braziliensis
- 3) Cutánea; producida por el complejo L. tropica, L. mexicana y L. braziliensis.

Actualmente se han desarrollado métodos bioquímicos (densidad de DNA, radiorespirometría, electroforesis de enzimas, etc.) (56) e inmunológicos (diferenciación inmunológica: uso de anticuerpos monoclonales, inmunodifusión, etc.) (22), para la identificación de las cepas de parásitos aisladas.

Leishmaniasis visceral: las especies y subespecies que provocan esta enfermedad son: L. donovani donovani, L. d. infantum, y L. d. chagasi. Estos organismos después de una multiplicación preliminar, abandonan la piel y se extienden hacia los órganos internos, específicamente a bazo, hígado y médula espinal. La hepatomegalia y la esplenomegalia son el resultado de la infección de estos órganos. Si no es tratada puede ser mortal. Algunas veces después de la cura, los pacientes pueden desarrollar la Leishmaniasis dérmica ó Post-Kala-Azar (LDPK) (61,66).

Leishmaniasis mucocutánea y cutánea: a pesar de que muchas especies de Leishmania tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo provocan infecciones



DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LEISHMANIASIS CUTANEA
EN EL
NUEVO MUNDO

cutáneas, la patogénesis básica de ellas es la misma (57,60,61). L. tropica y L. major son los agentes infecciosos de la Leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo. L. mexicana y L. braziliensis son las especies que producen la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea de Centro y Sudamérica.

La Leishmaniasis cutánea se caracteriza por su tendencia general a sanar espontáneamente, excepto cuando las lesiones se localizan en las orejas (61). En la mayoría de los casos estas infecciones consisten en lesiones de la piel (pápulas o nódulos) relacionadas con el sitio de inoculación del parásito por la picadura del mosquito. Estas lesiones responden rápidamente al tratamiento de quimioterapia (Leishmaniasis cutánea local), no son mortales pero pueden llegar a causar desfiguramientos. Algunas veces se presentan infecciones de curso crónico tales como la Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), en la cual las lesiones ulcerativas primarias se van diseminando con el tiempo, son resistentes al tratamiento con fármacos y presentan características histológicas distintivas (24,61,72,77).

En el caso de L. braziliensis, las lesiones primarias se extienden hacia las mucosas de la nariz y la boca provocando la Leishmaniasis mucocutánea. Esta enfermedad es frecuente en Sudamérica, los efectos degenerativos de las cavidades orales y nasofaríngeas que resultan en desfiguramientos faciales son llamadas Espundia (85,86).

La respuesta inmunológica del huésped en la Leishmaniasis cutánea es primordialmente de tipo celular (20), y los casos de cura espontánea se han relacionado con la generación de hipersensibilidad retardada. En cambio, las infecciones crónicas se han relacionado con una deficiencia en la respuesta inmune celular del huésped (66,67).

Algunas cepas de ratones son innatamente resistentes a la infección con

Leishmania y esto parece estar controlado genéticamente (68). También existen cepas que son susceptibles y se han utilizado junto con hámsteres dorados como sistemas "in vitro" para estudiar varios aspectos de la enfermedad, así como para mantener la virulencia de los parásitos por transferencias sucesivas en el laboratorio (26).

Aspectos Patológicos de la Leishmaniasis cutánea.

Las características histopatológicas de la Leishmaniasis cutánea varían de acuerdo con: la lesión primaria, la forma clínica de la enfermedad, la región geográfica, el estado inmunológico del huésped y la cepa o subespecie del parásito que produce la infección (60). El cuadro histológico general varía desde piel normal hasta intensa infiltración celular y formación de granulomas con necrosis del tejido (71,72). Aparte de la respuesta granulomatosa, Leishmania induce otro tipo de respuestas que destruyen el tejido de la dermis (daños en colágena, fibras elásticas y producción de fibrosis) y la epidermis (hiperplasia) (73), debida probablemente a una respuesta de autoinmunidad (66), o quizás a la acción directa del parásito sobre estos componentes (9).

Existen muchos reportes en la literatura que describen la histología de las lesiones de la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en enfermedades humanas y en infecciones experimentales. Sin embargo, los estudios para esclarecer los eventos histológicos iniciales de la piel, después de la inoculación del parásito en el huésped son escasos.

Cuando el insecto vector inocula promastigotes en la piel del hombre, permanecen un cierto tiempo en contacto con componentes de la dermis. La dermis esta constituida principalmente por una matriz extracelular en la

cual se encuentran inmersas células y glándulas. En esta matriz se efectúa la interacción inicial huésped-parásito y posiblemente las moléculas que la integran juegan un papel determinante en la enfermedad. Por otra parte, es importante definir cuáles son los eventos que ocasionan la degradación de ciertos componentes de la matriz (ejem. colágena), durante las infecciones con Leishmania.

IV. Matriz Extracelular.

Las macromoléculas que integran las matrices extracelulares, son polímeros iónicos lineales con capacidad de estructurarse en complejos supramacromoleculares, y son secretadas por células locales, generalmente fibroblastos (79).

La matriz extracelular de la piel esta constituida por glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas (4,47). Los GAGs o mucopolisacáridos son un grupo heterogéneo de polímeros lineales, constituidos por secuencias repetitivas de disacáridos formados por un aminoazúcar y un ácido urónico. Su alta capacidad hidrofílica les permite formar geles hidratados muy porosos que ocupan un gran volumen, donde se encuentran embebidas las fibras de colágena, y se facilita la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células. Los GAGs se encuentran en tejidos y fluidos de todos los metazoarios y con excepción del ácido hialurónico, estan sulfatados y unidos covalentemente a diferentes núcleos proteicos, los cuales reciben el nombre de proteoglicanos. Los grupos que se encuentran en piel son: Acido hialurónico, Condroitín sulfato-A y C, Dermatán sulfato, y heparina.

Se han realizado varios estudios que señalan el papel que pudieran

tener ciertas macromoléculas específicas de la matriz extracelular, como es el caso del ácido hialurónico en la regulación de algunos procesos básicos del desarrollo.

Las colágenas son una familia de proteínas fibrilares catiónicas codificadas por diversos genes. La cadena polipeptídica contiene cerca del 30% de glicina, 20% de prolina e hidroxiprolina y un 15% de alanina. Una molécula de colágena es una estructura triple-helicoidal, con cadenas polipeptídicas con triplete repetitivos Gly-X-Y, tiene un diámetro de 1.4 nm y una longitud de 300 nm (4,62,78). Se han caracterizado varios tipos de colágena que dependen generalmente del tipo de cadena polipeptídica que integra la triple hélice (62).

Las colágenas presentes en la piel son: tipo I, III, IV, V y VII. La colágena I y III se originan de un mismo precursor, la protropocolágena que es sintetizada intracelularmente. Estas moléculas pueden formar agregados macromoleculares más complejos cuando son secretados al medio extracelular, como fibras (62).

La colágena tipo I es el componente estructural más abundante en piel, hueso, tendón y otros tejidos fibrosos, donde forman fibras largas y bandeadas. La colágena tipo III se presenta en pequeñas fibras asociadas a colágena I y a heparán sulfato, se encuentra en los intersticios celulares en piel, aorta, hígado y pulmón (62).

La colágena tipo IV es específica de membranas basales, que son estructuras subyacentes de células epiteliales y se encuentran rodeando células musculares y nerviosas. La colágena tipo V presenta una amplia distribución entre diferentes tejidos, se parece a las colágenas intersticiales en que tienen un precursor, la longitud estabilidad de la triple hélice. Parece

formar pequeñas fibras con un arreglo pericelular en la vecindad de células musculares (62).

La colágena tipo VII, también denominada colágena de "cadena larga", ya que su dominio helicoidal parece ser al menos 1.5 veces más grande que el de colágenas intersticiales. Se encuentran como fibras de anclaje uniendo membranas basales a estroma, como en la epidermis y el amnios (62).

Las colágenas son elementos estructurales, que interactúan con glicoproteínas tales como la fibronectina y la laminina, que son moléculas involucradas en interacciones con matriz extracelular. Existe una especificidad en la unión de glicoproteínas a ciertos tipos de colágenas, en consecuencia estas proteínas también se unen a los receptores celulares, influyendo en la sobrevivencia, diferenciación y migración celular (78).

Las fibras elásticas del tejido conjuntivo están constituidas por un material amorfo e hidrofóbico muy abundante -la elastina- y por una glicoproteína reticular o microfibrilar de carácter ácido, rica en cisteína. La elastina es un polímero supramolecular insoluble con capacidad fluorescente, de 70 Kd de peso molecular, donde el 90% de los aminoácidos que la forman son no polares (4,78).

La fibronectina es una glicoproteína de aproximadamente 250 Kd, que se encuentra en matrices extracelulares, en superficies celulares, intracelularmente y en plasma. La fibronectina del plasma existe como una glicoproteína dimerica unida a través de enlaces disulfuro (S-S), con subunidades de 200 y 220 Kd. En la superficie celular o en matrices puede encontrarse formando agregados poliméricos mayores que constituyen homopolímeros o heteropolímeros. Esta es una molécula multifuncional que posee regiones específicas de reconocimiento a una variedad de componentes que integran las matri-

ces extracelulares (colágenas, proteoglicanos y ácido hialurónico). Se ha demostrado que la fibronectina estimula migración celular en algunos sistemas, y participa estimulando la adhesividad y unión entre células (78).

La laminina es una glicoproteína que se localiza específicamente en membranas basales y células epiteliales. Tiene un peso molecular de 1×10^7 D, está constituida por 4 subunidades unidas entre sí por puentes disulfuro, 3 cadenas B y una A de 200 y 400 kD. Su aspecto ultraestructural semeja una cruz latina, donde presenta regiones con capacidad de reconocer y unir específicamente diferentes macromoléculas como la colágena tipo IV, el receptor de células epiteliales, sulfato de heparán y otros. La capacidad de reconocimiento multivalente de esta molécula se ha atribuido a el papel regulador en el proceso de adhesividad intercelular y en la formación de membranas basales (4,78).

Durante el desarrollo de un organismo, la formación de un órgano, o la diferenciación de un tejido específico, por procesos celulares tales como proliferación, interacciones, diferenciación, migración y muerte celular, la expresión del genoma celular se ve modulada por las condiciones del microambiente extracelular. Las diferencias cuantitativas y cualitativas, así como las temporales y espaciales de sus componentes, le confieren diferentes propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas al medio extracelular, lo cual determina que sea una entidad muy específica (78).

El estudio de los componentes de matriz extracelular en diversos procesos celulares ha conducido a conocer la posible influencia que estos tienen sobre varios sistemas biológicos. En el caso de la Leishmaniasis uno podría preguntarse si los componentes de la matriz de la piel interaccionan directamente con los parásitos, induciendo la diferenciación de

promastigotes a amastigotes o estimulando otros procesos celulares.

Planteamiento del problema.

La información disponible sobre los eventos iniciales de la infección de las Leishmaniasis, se enfoca principalmente a la interacción macrófago-parásito. Algunos autores han realizado estudios "in vitro" para tratar de caracterizar los posibles factores que intervienen en el proceso de reconocimiento y unión de Leishmania a el macrófago. Es así como estas investigaciones se han dirigido hacia la determinación de las moléculas de la superficie del parásito que se unen directamente a los receptores del macrófago o activan la vía alterna del complemento y se unen a C3.

Por un lado se han involucrado en este evento componentes intrínsecos de la superficie de las células interaccionantes. En la superficie del macrófago se han descrito 2 receptores principalmente: el receptor manosa-fucosa (MFR) y el receptor para la proteína C3 del complemento (CR3), mientras que en el parásito se han identificado dos antígenos importantes de la superficie del promastigote, la glicoproteína gp63 y el glicolípido del factor de excreción (29,75), que parecen ser moléculas muy conservadas presentes en forma similar en todas las especies de Leishmania estudiadas.

David Russell, 1987 presentó evidencias de que gp63 Kd, una glicoproteína que contiene manosa, se une a C3 y sugirió que puede interactuar con el complemento y también con los receptores manosa-fucosa del macrófago. Bordier y cols, 1987 han demostrado que gp63 Kd está anclada a la membrana de promastigotes por un residuo de fosfolípido similar al descrito en una glicoproteína específica de L. brucei. Existe evidencia de que un glicolípido de superficie de promastigotes de L. major actúa como ligando

para los receptores del macrófago. Handman y cols (1985), demostraron que los fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el glicoconjugado inhibía la unión de promastigotes a macrófagos, sugiriendo que esta macromolécula actúa probablemente como ligando. Sin embargo, el receptor específico de esta molécula aún no ha sido bien definido, además de que Russell (75) encontró que la molécula equivalente en L. mexicana no se une a C3.

Es posible que la acción combinada de los diferentes ligandos-receptores encontrados en las interfases de las células interaccionantes, jueguen diferentes papeles, que sean los responsables de la transformación del parásito y el inicio de la infección.

Por otro lado, también se han hecho intentos para caracterizar componentes externos, como son las macromoléculas de la matriz extracelular de la piel del huésped, que de alguna forma tienen contacto con el macrófago y el parásito y además son el medio ambiente en el cual se desarrolla la interacción inicial huésped-parásito, y que por lo tanto pudieran estar involucradas en este proceso.

Así, por ejemplo Avila y cols.(1983), reportaron que el suero de pacientes con Leishmaniasis cutánea americana contenía cantidades significativas de anticuerpos antilaminina, y sugirieron que quizás la laminina protegía de alguna forma al parásito durante su entrada al huésped, ya sea recubriéndose con ella durante la inoculación o que posea en su superficie una molécula semejante a la laminina. Recientemente este autor presentó evidencias ultraestructurales de la presencia y localización de una molécula semejante a la laminina, distribuida en los límites de los bordes del reservorio flagelar y en el extremo opuesto del flagelo de promastigotes y

amastigotes (17).

Wyler y cols. 1985, encontraron que el macrófago tiene receptores para la fibronectina en su superficie y propusieron que este era el factor que participaba en la unión del parásito al macrófago (82).

Uno de los aspectos de las Leishmaniasis que no se han estudiado adecuadamente, son los primeros eventos que ocurren cuando el parásito se pone en contacto con la matriz extracelular de la piel del huésped que parasita. De esta forma se desconoce si las leishmanias se asocian preferencialmente con los componentes de la matriz extracelular de la piel del huésped (colágenas, glicoproteínas y proteoglicanos) y si estos influyen en procesos tales como: diferenciación, endocitosis, sobrevivencia y proliferación del parásito, considerando la participación de los componentes de la matriz extracelular en procesos de proliferación, diferenciación y migración celular en otros sistemas ya estudiados (78).

La abundancia relativa de los diferentes tipos de macromoléculas de matriz y la forma en que se encuentran organizadas dentro de la misma varían enormemente, dando origen a una gran diversidad de formas, cada una adaptada específicamente a las necesidades del tejido en el que se encuentran (7). Algunos tipos de Leishmania se dirigen a lugares específicos donde desarrollan la infección, tal es el caso de la "úlcera de los chicleros" en el sureste de México, en el cual los parásitos infectan el cartilago de las orejas. De ahí que exista la posibilidad de que la abundancia de ciertos componentes de matriz extracelular, como lo es en este caso el condroitín sulfato, participe de alguna forma en la determinación de la enfermedad, hacia ciertos lugares específicos.

En los estudios histopatológicos realizados tanto en pacientes con

Leishmaniasis así como en infecciones experimentales, se observa desde las etapas iniciales de la infección un daño dramático en el tejido conjuntivo. Estas alteraciones implican degradación de estos materiales por mecanismos desconocidos. Algunos autores lo atribuyen a respuestas de autoinmunidad efectuadas directamente por macrófagos, y una de las explicaciones sugeridas es que posiblemente las moléculas que constituyen los FE, al ser introducidas junto con los parásitos a la piel del huésped, modifiquen la estructura de los componentes de la matriz extracelular, provocando un desconocimiento por parte de los macrófagos que recurren a la zona de infección y dando como resultado el ataque hacia estas macromoléculas.

Otros investigadores, mencionan que posiblemente el daño sea producido por la acción directa del parásito (9), aunque para esta afirmación no existen evidencias experimentales.

OBJETIVOS.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Hacer una caracterización general de la cepa de Leishmania mexicana por aglutinación con lectinas y carga superficial.
- 2) Conocer el comportamiento del parásito durante su ciclo de vida: las formas promastigote en cultivos axénicos, las formas amastigotes en animales de laboratorio, y la diferenciación de las formas amastigote a la promastigote.
- 3) Realizar infecciones "in vitro" con macrófagos peritoneales de ratón, y determinar por técnicas de fluorescencia e inmunofluorescencia indirecta, los eventos iniciales de la infección de los mismos.
- 4) Realizar estudios "in vitro" con una cepa de Leishmania mexicana para determinar la asociación preferencial del parásito con algún(os) componente(es) de la matriz extracelular de la piel del huésped.

MATERIALES Y METODOS.

I Caracterización de los parásitos.

1. Parásitos.

La cepa de parásitos utilizada en los experimentos fue proporcionada por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. Estos parásitos fueron originalmente extraídos de un paciente (H. Farias) en el norte del país, que presentaba un tipo de Leishmaniasis cutánea difusa semejante a la producida por especies pertenecientes al complejo Leishmania mexicana, y por esa razón se le denominó L. mexicana pifanoi.

Los parásitos se mantuvieron por resiembras periódicas de 5 días en Medio 199 (GIBCO) suplementado con timidina 1.6mM, hipoxantina 10mM, piruvato de sodio 10mM, 2-mercaptoetanol 0.02%, penicilina y estreptomicina 1% y suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO) 10%; y en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (GIBCO) con antibióticos 1% y 10% de SFB (Hyclone, lote 118599). Los cultivos axénicos de las formas promastigotes se mantuvieron a 28°C en frascos de cultivo de 25 ml (Nuncion).

Muestras para microscopía electrónica.

Se tomaron muestras de los promastigotes cultivados, se lavaron con PBS pH 7.4 (amortiguador fosfato salino: fosfato de potasio dibásico 0.2M, fosfato de sodio monobásico 0.1M, 5.9726 g de NaCl) y se procesaron para microscopía electrónica (apéndice A), para observar las características morfológicas del parásito se hicieron cortes semifinos de 1 µm de espesor y se observaron con el microscopio óptico. Para la observación en el

microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM10) fue necesario hacer cortes finos de 150 nm de espesor.

2. Infección "in vivo" en animales de laboratorio.

Con la finalidad de mantener la capacidad infectiva de los parásitos y poder estudiar la forma amastigote durante el ciclo de vida del mismo, se utilizaron hámsteres dorados machos de dos meses de edad, como huésped vertebrado para realizar la infección con Leishmania. Para esto se inoculó en las extremidades posteriores de hámsteres, 0.1 ml de una suspensión de promastigotes de 6 días de cultivo. Los hámsteres se revisaron periódicamente hasta observar el desarrollo de la infección, determinado éste por las lesiones externas. Las infecciones posteriores se realizaron con amastigotes recién extraídos de los hámsteres infectados.

Extracción de los amastigotes de hámsteres infectados con leishmanias.

Después de aproximadamente dos meses de la inoculación del parásito en las extremidades posteriores del hámster, se extrajeron los parásitos de las lesiones de la siguiente forma: se sacrificó el animal con un exceso de éter, en condiciones estériles (campana de flujo laminar), se limpió la pata del hámster con alcohol, se cortó con unas tijeras y se colocó en una caja de petri con medio de cultivo. Con la ayuda de unas tijeras se disecó el tejido infectado, y posteriormente se absorbió con una pipeta Pasteur el líquido donde se encontraban las células infectadas y los amastigotes libres. Se tomó un inoculo alto (aproximadamente 0.5 ml) y se sembró en un frasco de cultivo con Medio 199. Luego se incubaron las células a 28°C para la transformación de los amastigotes a formas promastigotes.

Infeción de ratones Balb/c.

Para la infección de estos ratones se utilizaron amastigotes extraídos de las patas infectadas del hámster, que se inocularon en las extremidades traseras de ratones de dos meses de edad. De los 5 ratones infectados se sacrificaron 4 a diferentes intervalos de tiempo (6, 12, 26 y 30 días después de la inoculación). Los animales se revisaron periódicamente y se dejó uno vivo para observación. De las infecciones desarrolladas se tomaron muestras de piel y se procesaron para microscopía electrónica (apéndice A). Se observaron en cortes finos y semifinos en un microscopio óptico (American Optical) y en uno electrónico de transmisión (Zeiss EM10).

3. Pruebas de aglutinación con lectinas.

Con la finalidad de hacer una caracterización de los parásitos y verificar si pertenecen al complejo L. mexicana, se realizaron pruebas con diferentes lectinas para observar las propiedades de aglutinación de las leishmanias.

Las lectinas utilizadas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína fueron: Concanavalina A (Con A), Aglutinina de soya (SBA), aglutinina de germen de trigo (WGA), y aglutinina de cacahuate (PNA) a una concentración de 50 µg/ml en PBS. Los parásitos se lavaron con PBS, se colocaron cantidades iguales en tubos eppendorf, se adicionaron 50 µg/ml de cada una de las lectinas en cada uno de los tubos y se incubaron a 0°C por 25 minutos. Al término de la incubación los parásitos se lavaron con PBS, y se montaron en una preparación con glicerol al 66% en PBS, para observarlos en un microscopio de epifluorescencia (American Optical).

4. Carga de Superficie.

La carga superficial de los parásitos en cultivo, se evaluó midiendo su movilidad electroforética (m.e.) por medio de un aparato de electrofóresis celular (Rank Brothers, Cambridge England), provisto de una cámara cilíndrica de 4 ml de volumen y cerrada en sus extremos por dos electrodos de platino. La cámara va sumergida en un baño de agua a 25°C. La velocidad de migración de las células se determinó midiendo el tiempo que tardaban los parásitos en recorrer una distancia total de 50 μ m en ambas direcciones, lo cual se logró aplicando una diferencia de potencial de 50 V a los electrodos. Los parásitos se lavaron con una solución de NaCl 0.145M pH 7, y se colocaron en la cámara de electrofóresis celular. La m.e. se calculó con la siguiente fórmula: $m.e. = d/t \times D/V$, donde d es la distancia que recorren las células durante la medición; t es el tiempo en segundos requerido por las células para cubrir la distancia d; D es la distancia entre los dos electrodos (16.5 cm) y V el potencial aplicado a los electrodos. Se obtuvieron los valores de m.e. para formas promastigotes con diferente número de resiembras, cultivadas en presencia de un sustrato de colágena I, y de formas amastigotes.

Reacción con ferritina catiónica.

Para detectar los grupos que le confieren la carga negativa superficial a las células, se hizo un marcaje con ferritina catiónica (Miles, Yeda LTD) el cual evidencia grupos ácidos ionizables a pH neutro (34). Los parásitos se lavaron con PBS 2X, se fijaron las células y se hizo el marcaje con ferritina catiónica a una concentración de 1.5 mg/ml por 30 minutos, después

se procesaron para microscopia electrónica y se realizaron posteriormente cortes finos para observar en el microscopio electrónico de transmisión.

II Interacciones macrófago-parásito "in vitro".

1. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón.

Se sacrificó un ratón de 2 meses de edad, en condiciones estériles, se expuso el abdomen y con una jeringa se inocularon en la cavidad peritoneal, de 3 a 5 ml de medio 199 ó MEM, luego se dió un leve masaje en el abdomen y se extrajo el líquido. Las células se colocaron en una caja de petri 35x10 mm estéril, con un cubreobjetos en el fondo, en un volumen aproximado de 0.5 ml y se adicionaron 1.5 ml de medio de cultivo/caja. Estas se incubaron por 12 a 24 hrs en una cámara húmeda a 37°C, para que los macrófagos se adhirieran en el cubreobjetos.

2. Infección de macrófagos peritoneales con leishmanias in vitro.

Los macrófagos adheridos se lavaron con Medio de cultivo 3X y se le adicionaron 0.5 ml de cultivo de parásitos en confluencia, con 1.5 ml de medio nuevo, y se colocaron en una cámara húmeda a 28°C, durante una hora, posteriormente las células se incubaron a 37°C. Se hicieron interacciones por 24, 36, 48 y 72 hrs, al término de estos periodos las células se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con GIEMSA en amortiguador de fosfatos pH 6.4. Las preparaciones se aclararon con xilol, se montaron con resina en portaobjetos y se observaron en un microscopio de luz a 100x para localizar los parásitos endocitados.

3. Interacción parásito-macrófago, marcaje con Con A.

Los ensayos realizados con las lectinas nos permitieron seleccionar un marcador de la superficie de esta cepa de Leishmania. Debido a que los promastigotes sólo aglutinaron con Concanavalina A, se utilizó ésta lectina conjugada con FITC, en infecciones in vitro con macrófagos peritoneales de ratón con la finalidad de evidenciar los grupos antigénicos de la superficie celular del parásito, durante la interacción inicial con los macrófagos, y de esta manera discernir si sufren alguna alteración durante este evento, que sugiriera la función de los mismos.

A. Reacción de macrófagos peritoneales de ratón con Con A-FITC.

Para observar la reacción de la lectina con los macrófagos peritoneales de ratón utilizados, se siguió el mismo procedimiento descrito en la parte I-3 (pruebas de aglutinación con lectinas).

B. Interacción Leishmania-macrófago.

Se realizó un ensayo de infección "in vitro" de macrófagos con parásitos a diferentes intervalos de tiempo, marcando la superficie de las células con Con A-FITC.

Los macrófagos peritoneales de ratón se incubaron con Con A sin fluoresceína por 30 minutos en frío, para bloquear los receptores de su superficie para esta lectina. Posteriormente se realizó la interacción con los parásitos durante una y dos horas a 37°C al término del cual las células se lavaron para eliminar los parásitos no adheridos a los macrófagos y se fijaron con formaldehído 4% en PBS por 15 minutos, después se lavaron con PBS y se permeabilizaron con acetona fría por 15 segundos. Luego se incubaron con Con A-FITC durante 20 minutos, y se montaron en una preparación con glicerol

66% en PBS, para observarlo en un microscopio de epifluorescencia.

4. Marcaje con anticuerpos antileishmania.

A. Inmunización de ratones.

Como una alternativa para marcar los antígenos de superficie del parásito y seguir su posición durante las fases iniciales de la infección de macrófagos, se produjeron anticuerpos policlonales contra L. mexicana que se utilizaron para el marcaje de moléculas antigénicas, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Para obtener el suero antileishmania, se inocularon intraperitonealmente 5×10^8 promastigotes vivos en PBS, en 8 ratones machos de la cepa NMR1. Se hicieron 3 inoculaciones periódicas de 8 días cada una, y a la 5a. semana de iniciado el tratamiento, se obtuvo por punción sanguínea el suero de 3 ratones inmunizados. Posteriormente se extrajo el suero de los demás. El suero antileishmania se inactivó a 56°C por 15 minutos para evitar la acción del complemento sobre los parásitos.

B. Reacción de suero antileishmania con los parásitos.

Para detectar la presencia de anticuerpos antileishmania en el suero de ratón, los parásitos de un cultivo se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 3% en una solución de NaCl 0.145M, pH 7.0, durante 15 minutos y después se bloquearon los grupos aldehído con una solución de Cloruro de amonio 0.005% en PBS por 30 minutos. Se hizo un lavado con PBS-SFB 1% para que la reacción no fuera inespecífica y entonces se adicionaron a 25 μl de parásitos en una solución de NaCl 0.145M, 25 μl de suero antileishmania, como 1er. anticuerpo y se incubaron por 20 minutos. Posteriormente se lavaron varias veces con la solución salina y se adicionaron 5 μl de Anti-

IgG de ratón conjugado con FITC, como segundo anticuerpo, en 25 μ l de NaCl 0.145M y se incubaron por 20 minutos. Al término de la incubación los parásitos se lavaron 3X con la solución salina y se montaron en glicerol al 66% para observarlos en el microscopio de epifluorescencia.

C. Interacción parásito-macrófago, inmunofluorescencia indirecta.

Se realizaron interacciones de parásitos con los macrófagos, por 2, 5, 24 y 48 hrs. Al término de cada interacción, las células se incubaron con suero de conejo inactivado por 20 minutos, después se fijaron con paraformaldeido 3% en PBS por 15 minutos. Para las interacciones de más de 2 horas, donde ya se encuentran parásitos endocitados, se permeabilizaron las células con acetona a 0°C por 3 minutos y se hizo un bloqueo posterior con suero de conejo inactivado al 10% en NaCl por 30 minutos. Las células se incubaron con el 1er. anticuerpo (antileishmania) durante 20 minutos, y después con el 2o. anticuerpo (anti IgG de ratón-FITC) también por 20 minutos. El cubreobjetos donde estaban adheridas las células se lavó perfectamente con NaCl 0.145M y se montó con glicerol sobre un portaobjetos, para observarlo en un microscopio de epifluorescencia.

III. Matriz extracelular y parásitos.

1. Histoquímica de piel de ratón.

Con la finalidad de determinar la composición celular y la distribución general de los componentes de la matriz extracelular del sistema que se utilizó en los experimentos, se obtuvo un fragmento de piel de ratón de dos meses de edad, cepa NMR1. Este se cortó en pedazos más pequeños de aproximadamente 0.1 cm, que fueron separados en 4 lotes, y fijados con glutaraldehido 2.5% (Paraformaldehido 4%, Glutaraldehido 2.5%, CaCl_2 en

anortiguador de cacodilatos 0.1M). Cada lote se trató por 2 h con 3 colorantes catiónicos diferentes (un colorante por lote): ácido tánico 1%, rojo de rutenio 0.1% y azul alciano 1% pH 1 y 2.5. Después de la reacción con los colorantes, las muestras se procesaron para microscopía electrónica (apéndice A), y posteriormente se obtuvieron cortes semifinos para observar en el microscopio de luz.

2. Obtención de colágena tipo I de tendón de cola de rata.

Se hizo una extracción de colágena tipo I de tendón de cola de rata, solubilizándola en ácido acético 0.5M. Una parte de esta colágena en solución se congeló y otra se liofilizó, para su almacenamiento.

3. Interacción de cortes de piel de ratón con L. mexicana.

Para observar si los parásitos tenían alguna preferencia específica por algún componente de la matriz extracelular, se utilizó como sistema experimental los cortes de piel de ratón NMR1, para hacer interacciones "in vitro" con leishmanias y observar en un microscopio invertido el desarrollo de la interacción.

Se sacrificó un ratón de la cepa NMR1 de dos meses de edad y se cortaron pedazos de piel del dorso del animal de aproximadamente 1 cm². Se colocaron en solución salina (NaCl 9%, KCl 0.042%, CaCl₂) y se congelaron con un líquido (Tissue-Tek III) para hacer cortes por congelación en un criostato (HistoStat, American Optical). Se obtuvieron cortes tangenciales a la epidermis de la piel de 35-40 µm de espesor, y se adhirieron a cubreobjetos limpios, donde se dejaron secar. Posteriormente se seleccionaron los cortes, se lavaron con agua bidestilada estéril, y se colocaron en cajas de Petri estériles (35x10 mm). Se adicionaron 0.5 ml de parásitos en medio de cultivo y 1.5 ml de medio nuevo. La interacción se realizó por 24

hrs. a 28°C, periodo durante el cual se observaron a diferentes tiempos en un microscopio invertido con contraste de fases (Bio-Star, American Optical). Los controles consistieron en cortes de piel de ratón con M 199, en las mismas condiciones que los experimentales.

A) Tinción con azul alciano 1%.

Para verificar si el parásito degrada mucopolisacáridos de la matriz extracelular durante las interacciones, se procesaron los cortes al término de la interacción con azul alciano (AA) pH 1.0 y 2.5 para detectar grupos sulfatados y grupos carboxilo respectivamente.

Los cortes se lavaron con PBS varias veces para eliminar los parásitos y los residuos del medio utilizado, se fijaron con formaldehído 4% en PBS por 1 h., se lavaron con agua bidestilada y se tiñeron un control y un experimental con AA pH 1.0 y otros con AA pH 2.5 por 2 horas. Después se lavaron varias veces se deshidrataron en series graduales de alcoholes (70°, 85°, 95° y absoluto 2X), se aclararon con xilol y se montaron con resina sintética en un portaobjetos. Los controles y los experimentales se observaron en un microscopio de luz (American Optical) y en un estereoscópico para compararlos. Se realizaron 5 experimentos con interacciones por duplicado.

B) Tinción con Safranina, para cuantificación indirecta de mucopolisacáridos.

Para medir indirectamente la cantidad de mucopolisacáridos de la piel de ratón por corte, se utilizó la técnica descrita por Kiviranta et al, 1985 que consiste en utilizar un colorante específico para glicosaminoglicanos (GAGs), como lo es el azul alciano o la Safranina O, y medir indirectamente la cantidad de estas macromoléculas por la cantidad de colorante que se une

a estos componentes, espectrofotométricamente.

Se hizo un espectro de absorción de la safranina, para determinar el pico de absorción máxima, en un espectrofotómetro Beckman. Se construyó una gráfica de absorbancia del colorante en la solución de HCl 2M en 50% de etanol (v/v), en función de la concentración del colorante. Para esto se hicieron diferentes diluciones del colorante en la solución eluyente en $\mu\text{g/ml}$ y se midió su absorbancia a 530 nm; con esto se obtuvo la cantidad de GAGs por corte, medidos indirectamente por la cantidad de moléculas de colorante unidas a los GAGs

La interacción de los parásitos con los cortes de piel se realizó como se describió en la parte III-3, a diferentes intervalos de tiempo (3, 6 y 24 hrs). Se realizaron series de experimentos con un promedio de 6 cortes de piel para los experimentales y el mismo número para los controles por ensayo, en un total de 5 ensayos. Después de cada interacción, los cortes se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído 3% y se tiñeron con Safranina O 0.5% en amortiguador de acetato de sodio 0.1M, pH 4.6 a temperatura ambiente por 15 minutos. Los cortes se despegaron del cubreobjetos con una espátula y se colocaron en un tubo de ensayo con 0.6 ml de la solución de HCl 2M en metanol 50% (v/v), para solubilizar la cantidad de colorante presente en cada corte después de la interacción.

Los tubos de ensayo que contenían los cortes de piel, se agitaron suavemente, durante unos minutos, hasta que el colorante fue extraído completamente, luego se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y se midió la absorbancia de las soluciones coloreadas a 530 nm, en un espectrofotómetro. Los datos obtenidos se transformaron a cantidad de colorante en $\mu\text{g/ml}$, utilizando la gráfica 1.

4. Interacción de Leishmania con geles de colágena tipo I, como sustrato.

A) Preparación de geles de colágena.

La solución de colágena tipo I en ácido acético 0.5 M, se dializó contra agua bidestilada durante 24 hrs a 4°C, para eliminar el exceso de ácido acético. Se utilizó la técnica descrita por Montesano (14,39), con algunas modificaciones, para la preparación de los geles de colágena.

Se utilizaron 7 volúmenes de solución de colágena dializada, con un volumen de Medio Dulbecco concentrado 10X, con antibióticos penicilina y estreptomycinina al 1% y 2 volúmenes de bicarbonato de sodio 11.76 mg/ml, todas estériles. Los volúmenes anteriores se mezclaron en frío, en condiciones estériles hasta obtener una mezcla homogénea. Con una pipeta Pasteur se dispersó un cierto volumen en el fondo de una caja de Petri 35 mm, y con una micropipeta se colocaron 15 µl de la mezcla en pozos de una caja para Elisa (de 96 pozos). La mezcla se dispersó uniformemente en el fondo de los recipientes que la contenían para obtener una capa uniforme de colágena. Estas se dejaron incubando a 37°C durante 15 a 20 minutos para que gelificaran. Después se lavaron con medio de cultivo a utilizar y se dejaron un mínimo de 6 hrs en la incubadora para extraer el exceso de bicarbonato. También se hicieron geles de colágena sola, esto es, que se utilizó únicamente la solución de colágena pero más concentrada, después de dializarse con agua bidestilada. Después de esto se hizo una dilución 2:1 con agua bidestilada, y se tomaron las alicuotas con una micropipeta y se esparcieron en el fondo del recipiente a utilizar, se dejaron gelificar a 37°C durante 45 minutos. Antes de su utilización se lavaron con medio de cultivo.

B) Interacción de Leishmania con geles de colágena I.

Con la finalidad de observar si la colágena I, en forma aislada, tenía alguna influencia sobre el comportamiento de los parásitos, ya sea en crecimiento o diferenciación, así como verificar si no existía degradación de las fibras de colágena por los parásitos durante la misma, se procedió a realizar ensayos de interacción "in vitro" entre sustratos de colágena I y Leishmania.

Se prepararon geles de colágena tipo I como se describió en la parte A, en cajas para Elisa. Los parásitos se contaron con un hematocitómetro, se lavaron 1X con MEM y se adicionaron 1×10^6 parásitos por pozo en un volumen final de 200 μ l/pozo. Los controles consistieron en el gel de colágena con medio de cultivo. La interacción fue por 48 hrs. a 28°C.

C) Procedimiento de tinción con rojo sirio.

Se utilizó un método de tinción con rojo sirio específico para teñir geles de colágena proporcionado por J.L. Rosales (Dpto. de Bioquímica, CINVESTAV) para medir la cantidad de colágena por gel, y comparar los geles que habían interactuado con los parásitos respecto a los controles y observar si existía alguna diferencia.

Al término de la interacción, los geles se lavaron con PBS, se fijaron con glutaraldehído 2.5% y después se lavaron con una solución saturada de ácido picrico 2X, de 5 minutos por cada cambio. Los geles se tiñeron con una solución de rojo Sirio FSBA en ácido picrico saturado durante 2 hrs. Después se lavaron en una solución de HCl 0.01N hasta no detectar colorante, y se transfirieron cada uno de los geles a tubos de ensaye (10x75 mm), donde se adicionó 1 ml de una solución de NaOH 0.01N en metanol absoluto al 50% (v/v) /gel. Los tubos se agitaron suavemente durante un mínimo de 4 hrs, para ex-

traer el colorante unido a las fibras de colágena. Se midió la absorbancia de las soluciones coloreadas a 530 nm en un espectrofotómetro Beckman. Los datos de absorbancia se transformaron a μg de colágena, utilizando la equivalencia proporcionada por José L. Rosales (comunicación personal).

Se hizo un ensayo para determinar la concentración de la colágena en solución, utilizando el método de tinción con rojo sirio 0.1% para medir la concentración de la colágena. Se hicieron geles de diferentes volúmenes (10, 20, 25 y 30 μl) por duplicado, se tiñeron con rojo sirio como se describe en la parte C y se midió la absorbancia del colorante unido a la colágena a 530 nm. Los datos obtenidos se graficaron (gráfica 2 y 3) y se determinó la cantidad aproximada de colágena en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

D) Ensayos de interacción de los parásitos con geles de colágena.

En el primer ensayo, se tomó como variable la cantidad de parásitos (1×10^4 , 8×10^3 , 6×10^3 y 4×10^3) y la constante fue el volumen del gel de colágena (15 $\mu\text{l}/\text{pozo}$). Los controles fueron en las mismas condiciones que los experimentales pero sin parásitos.

El ensayo 2 consistió en variar el volumen del gel de colágena (10, 15, 20, 25 y 30 μl) y la constante fue la cantidad de parásitos (1×10^4). El tiempo de interacción en ambos ensayos fue de 48 hrs a 28°C. Una vez terminada la interacción se cuantificó la cantidad de colágena por gel utilizando el método de tinción con rojo sirio descrito en la parte C.

El 3er. ensayo se realizó en ausencia y en presencia de suero fetal bovino, con el objeto de ver si algún componente del suero, utilizado en las interacciones, inhibía la acción de alguna proteasa del parásito y que debido a esto no fuera posible observar el efecto de Leishmania sobre la colágena, en las interacciones realizadas.

Las interacciones se hicieron en las mismas condiciones descritas para las anteriores. Se ensayaron volúmenes de 2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 μ l, para cada uno de estos volúmenes se hicieron duplicados unos con MEM con SFB (Hyclone) y otros con MEM sin suero. Los controles se hicieron con el gel de colágena+medio de cultivo con suero y gel+Medio sin suero. Se hizo otro control en el cual se colocaron 1×10^6 parásitos, en medio con suero y otros sin suero en una caja de Elisa, para observar si la colágena estimulaba la proliferación y/o diferenciación de los parásitos. Los geles se procesaron como en los ensayos anteriores para medir la concentración de colágena por gel.

También se hicieron geles en cajas de petri de 35mm y se realizaron las interacciones con los parásitos por el mismo tiempo que en las cajas para Elisa. Estas interacciones fueron observadas periódicamente en un microscopio invertido y después teñidas con Rojo Sirio, para observar si había zonas de degradación.

RESULTADOS.

I. Caracterización de los parásitos.

1. Cultivo.

Los promastigotes que se cultivaron en MEM y M199 con 10% de suero fetal bovino (SFB), se mantuvieron en buenas condiciones a 28°C. En los primeros 3 días de cultivo los parásitos entran a una fase de división celular y se observan como formas redondas y ovaladas, pasado este periodo las leishmanias comienzan a alargarse y a desarrollar un flagelo más grande, que les confiere mayor movimiento. Además tienden a formar agregados de parásitos unidos por el flagelo (fig 1A). Unos agregados se observan en el fondo de la caja y otros en la superficie del medio ("natas").

Para mantener la forma diferenciada de los promastigotes, fue determinante el tipo y el lote de SFB utilizado en el medio. El mejor resultado se obtuvo con el SFB (Hyclone) lote 118599. Los promastigotes (fig. 1B) y amastigotes recién extraídos del hámster infectado (fig 1D), muestran los siguientes organelos: núcleo, cinetoplasto, saco flagelar, flagelo, reservorio, vacuolas, así como el sistema microtubular pelicular en la periferia de la célula.

2. Infección "in vivo" en animales experimentales.

A) Infección en hámster.

Con la finalidad de mantener la virulencia de la cepa de Leishmania cultivada axénicamente y de obtener formas amastigotes, se infectaron hámsteres en las extremidades posteriores con parásitos, tanto con promastigotes y amastigotes. Aparentemente la infección se desarrolló más

rápido cuando se utilizaron amastigotes. Un mes después de la inoculación los hámsteres desarrollaron nódulos formados por macrófagos infectados, que gradualmente provocaron deformación de las patas. En algunos animales estas lesiones se ulceraron, pero posteriormente cicatrizaron.

En los cortes semifinos de la piel de hámster infectado con Leishmania, se observó la infiltración celular de la dermis y la formación de nódulos de macrófagos infectados (fig 2B). Las células presentaron una gran cantidad de vacuolas, cada una de las cuales contenía uno o dos amastigotes (fig 2C). En la piel infectada no se observó la capa compacta de colágena que se puede apreciar, cuando se compara con un tejido normal, en la dermis (fig 2A).

B) Diferenciación de formas amastigotes a promastigotes "in vitro".

Los amastigotes extraídos de las patas infectadas de los hámsteres se sembraron en un medio de cultivo a 28°C. Durante las primeras horas los amastigotes incrementaron gradualmente su tamaño, comenzaron a alargarse, y entraron en fase de división celular. Posteriormente emergió el flagelo y en consecuencia el parásito fue más activo.

Aproximadamente a las 36 hrs. fue posible observar formas promastigotes completamente diferenciadas, y otra población de células redondeada con flagelo pequeño. A las 48 hrs los promastigotes comenzaron a unirse por el flagelo y a formar pequeñas rosetas, que continuaron en proceso de división celular (fig 1A).

C. Infección en ratones BALB/c.

Para comprobar la infectividad de la cepa de Leishmania utilizada en los experimentos con ratones BALB/c (reportados en la bibliografía como

susceptibles para especies de L. mexicana), se inocularon amastigotes recién extraídos de hámster infectado, en las extremidades posteriores de ratones.

A los 6 días de infección se tomó una muestra de la región inoculada con parásitos y se hicieron cortes semifinos. En ninguna de las preparaciones observadas detectamos la presencia de parásitos.

A los 12 días de infección, la dermis de la piel mostró amastigotes en el interior de macrófagos, así como libres en el espacio intracelular. En el tejido infectado se observó una dermis más laxa, con una gran cantidad de células y una característica evidente fue la remoción general de tejido conjuntivo, como puede observarse en la fig 3B. En la fig 3A, se observa un epitelio normal, que se utilizó como control para el estudio de los tejidos infectados con Leishmania. En este corte se compararon las características morfológicas de un tejido no infectado, que son un tejido conjuntivo más compacto, una gran cantidad de fibras de colágena, y algunas células como macrófagos y fibroblastos inmersas en él. A los 26 días y dos meses de infección, no se localizaron parásitos en la zona de inoculación.

Los ratones se revisaron periódicamente pero no mostraron síntomas de la enfermedad. El animal que se conservó por 8 meses, presentó inflamación en ambas patas pero no ulceración. En los cortes semifinos se observaron amastigotes infectando macrófagos (fig 4A) y extracelulares en la parte inferior de la dermis (fig 4B y C). Los macrófagos infectados presentaron vacuolas grandes que contenían hasta 5 amastigotes cada una. Del área donde se observaron los amastigotes extracelulares (fig 4C) se estudiaron los parásitos con en el microscopio electrónico, mostrando que algunos estaban bien preservados, y otros estaban lisados (fig 4D).

3. Interacción parásito-macrófago "in vivo".

Los hámsteres infectados con promastigotes y anastigotes de L. mexicana pifanoi desarrollaron infección aproximadamente a los 30 días después de la inoculación, tiempo en el cual los animales mostraron inflamación en ambas patas. A partir de este tiempo la inflamación aumentó gradualmente hasta deformarlas.

Cuando se observaron los cortes semifinos en el microscopio óptico detectamos la presencia de agregados de macrófagos infectados. El tejido presentó una apariencia muy vacuolada con una gran cantidad de células en la dermis (fig 2B). La remoción de tejido conjuntivo fue muy evidente cuando se comparó con una muestra de piel normal (fig 2A).

4. Pruebas de aglutinación con lectinas.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de aglutinación de los promastigotes con 4 lectinas diferentes conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estas lectinas fueron Concanavalina A (Con A), Aglutinina de germen de trigo (WGA), Aglutinina de soya (SBA) y Aglutinina de cacahuete (PNA). Estos se reportaron como positivo o negativo de acuerdo a dos criterios: el primero fue observar en el microscopio óptico si los parásitos eran aglutinados en presencia de cada una de las lectinas ensayadas, y el otro observar la marca de la superficie celular del parásito en un sistema de epifluorescencia.

La Con A fue la única lectina que dió reacción positiva. La aglutinación de de promastigotes en presencia de Con A se presentó a una concentración de 50 µg/ml. En presencia de las demás lectinas, los parásitos no mostraron aglutinación. El marcaje debido a la fluoresceína fue

muy evidente en los agregados de promastigotes aglutinados con esta lectina, en el microscopio de epifluorescencia (fig 5C).

Esta propiedad de aglutinación con Con A es común a la presentada para otras cepas de L. mexicana (p. ejem. L94A₃B₂ (4B), donde también observaron una reacción muy fuerte con Con A, pero no con otras lectinas ensayadas como la WGA. Este criterio puede ser útil para sugerir que la cepa con la cual trabajamos pertenece al complejo L. mexicana.

TABLA 1

Marcaje de promastigotes de L. m. pifanoi con lectinas conjugadas con FITC.

LECTINA	<u>L. m. pifanoi</u> (H. Farias) [lectina] 50 µg/ml	* <u>L. mexicana</u> L94A ₃ B ₂		
		10	100	200
Con A	POSITIVO	+	2+	2+
WGA	NEGATIVO			
SBA	NEGATIVO	-	-	+/-
PNA	NEGATIVO	-	-	-

*Datos tomados de Hernández AG (4B).

5. Movilidad electroforética.

Los valores de movilidad electroforética de promastigotes y anastigotes obtenidos por microelectroforesis celular, se resumen en la tabla 2. La movilidad electroforética (m.e.) se calculó de la siguiente ecuación: $me = d/t \times D/V$. La medición se realizó registrando el tiempo y sustituyendo los otros valores que ya se conocían.

Cada uno de los valores corresponde al promedio del número de medicio-

nes realizadas (25 ó 12) con su respectiva desviación estandar. Se aplicó la prueba T de student a los valores de m.e. de los promastigotes con X y XVIII resiembras y se verificó que los datos eran diferentes significativamente (menos del 0.001%).

La m.e. de promastigotes con X resiembras (-1.28) fue menor que la de aquellos con XVI y XVIII (-1.4). Estas diferencias indicaron un incremento en la carga negativa de los promastigotes con mayor número de resiembras. Algunos autores han observado que la m.e. varía según la fase de cultivo en la cual se encuentren las células. Pimienta y cols, 1983, reportaron que los promastigotes de L. mexicana en fase estacionaria tienen una carga superficial más negativa que los de fase logarítmica. De acuerdo a esto, las diferencias observadas en los ensayos anteriores pueden atribuirse al número de días de cultivo que tenían las células en el momento de la medición. Sin embargo, este dato no fue registrado cuando se realizaron las mediciones, por lo que las diferencias no pueden ser atribuidas únicamente a ese factor.

Los parásitos mantenidos en cultivos axénicos en M199 y MEM, con diferente lote de suero fetal bovino y aproximadamente el mismo número de resiembras no mostraron diferencias.

Los amastigotes presentaron valores de m.e. más bajos que los de promastigotes. Los promastigotes que fueron cultivados sobre un sustrato de colágena I de cola de rata presentaron los valores mayores de movilidad electrofóretica.

Las superficies celulares de promastigotes con XVI resiembras y amastigotes recién extraídos, se marcaron con ferritina catiónica para evidenciar grupos aniónicos sobre la membrana del parásito. Esta metodología se utilizó para corroborar los datos obtenidos por electrofóresis celular.

Con el microscopio electrónico de transmisión observamos los granos de ferritina catiónica distribuidos uniformemente sobre la superficie y el flagelo de los promastigotes (fig 7A). Los amastigotes mostraron un marcaje más intenso sobre su superficie celular. Sin embargo, como puede observarse en la fig 7B, los granos de ferritina se encuentran unidos a la membrana de la vacuola parasitófora que rodea al parásito.

TABLA 2

MOVILIDAD ELECTROFORETICA (m.e.) DE AMASTIGOTES Y PROMASTIGOTES DE L. m. pifanoi.

<u>L. mexicana</u>	N.R.	M.E.	S.D.	n
AMASTIGOTES		-0.7825 ± 0.1083		(12)
PROMASTIGOTES	X	-1.2832 ± 0.0388		(25)
PROMASTIGOTES	XVI	-1.4050 ± 0.0932		(25)
PROMASTIGOTES	XVIII	-1.4231 ± 0.0510		(25)
PROMASTIGOTES EN COLAGENA I	XV	-1.6415 ± 0.1230		(25)

N.R.= no. de resiembras
S.D.= desviación estandard
n= número de datos

II Interacciones parásito-macrófago " in vitro".

1. Infección de macrófagos peritoneales de ratón con L. mexicana

Los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal del ratón, se adhirieron al fondo de las caja de Petri, donde se mantuvieron en buenas condiciones, cultivados con MEM o M199 y 10% de SFB y con cambios periódicos

de medio de cultivo.

Durante las primeras horas de interacción se hicieron observaciones en el microscopio invertido con contraste de fases. Aproximadamente a las 2 hrs observamos parásitos adheridos a diferentes partes de la membrana del macrófago. Los macrófagos emitían prolongaciones en todas direcciones y los parásitos fueron englobados por diferentes lugares, sin una orientación o polaridad definida. Una vez que el parásito se adhería, era inmovilizado (y difícilmente lograba desprenderse a pesar de su movimiento) y gradualmente endocitado por el macrófago, hasta quedar dentro de una vacuola. A las 24 hrs observamos formas redondeadas del parásito dentro de la vacuola parasitofora, y a las 48 hrs encontramos amastigotes diferenciados. Estas observaciones se realizaron en preparaciones teñidas con GIEMSA. Mediante el uso de éste colorante fue posible diferenciar perfectamente la presencia de los parásitos intracelulares, el citoplasma de los amastigotes de una coloración azul, y el núcleo y cinetoplasto rosa, con algunas condensaciones de azul más oscuro (fig 5A y B).

Los amastigotes intracelulares se mantuvieron en buenas condiciones hasta las 48 hrs de infección, después comenzaban a destruirse tanto los amastigotes como algunos macrófagos.

2. Interacción parásito-macrófago, marcaje de antígenos de superficie de Leishmania con Con A-FITC.

Con la finalidad de estudiar si los antígenos de superficie de Leishmania cambian durante los eventos iniciales de la infección de macrófagos, se utilizó la Con A-FITC como marcador de la superficie del parásito.

Los macrofagos peritoneales de ratón se incubaron con Con A-FITC y dieron una reacción fluorescente muy evidente, por lo que para seguir el curso de los antígenos del parásito, teníamos que bloquear los receptores para Con A del macrófago. Antes de la interacción parásito-macrófago, éstos últimos se incubaron con Con A no marcada para bloquear los receptores de superficie. Las células interaccionaron por 1 y 2 hrs y después se marcó la membrana de los parásitos con Con A conjugada con FITC para evidenciar los antígenos de superficie del parásito en un microscopio de epifluorescencia.

En la fig 5D se muestra el resultado de este ensayo. Los parásitos dieron reacción positiva pero también la superficie del macrófago la dió, por lo que esta metodología no permitió aclarar el objetivo inicialmente planteado.

3. Interacción Leishmania-macrófago, utilización del suero antileishmania como marcador de antígenos de superficie del parásito.

A) Suero antileishmania.

Como una técnica alternativa para resolver el problema de conocer si los antígenos de superficie del parásito cambian durante su entrada al macrófago y su diferenciación a la forma amastigote, se decidió producir anticuerpos policlonales contra promastigotes de Leishmania en ratón.

Los sueros inmunes (antileishmania) obtenidos se probaron en los parásitos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Estos sueros presentaron un título de anticuerpos policlonales relativamente bajo (considerado éste por la intensidad de fluorescencia que observamos sobre la superficie del parásito, con las diferentes diluciones probadas, en el microscopio de epifluorescencia). Se necesitaron 25 μ l de suero

antileishmania en un volumen igual de NaCl 0.145M (1:1), pH7.0, para obtener una buena resolución bajo el microscopio de luz ultravioleta. A esta concentración de anticuerpos, observamos la superficie y el flagelo del parásito claramente definidos (fig 6A).

B) Infección de macrófagos peritoneales con Leishmania.

Las infecciones de macrófagos peritoneales con leishmaniasse repitieron en las condiciones ya establecidas. Al término de éstas se marcaron los antígenos de superficie de los parásitos con el suero inmune, con el propósito de seguir su curso durante las etapas iniciales de la infección.

Con esta metodología esperabamos definir si los antígenos del parásito sufrían alguna alteración al ser endocitados por el macrófago, o si Leishmania dejaba sus antígenos sobre la superficie del macrófago, así como también haciendo infecciones más largas, observar si los antígenos producidos contra promastigotes seguían reconociendo las formas amastigotes.

En el primer ensayo de infección de macrófagos con promastigotes, éstos últimos dieron una reacción fluorescente en la superficie, pero también observamos fluorescencia en el macrófago. Esto fue debido a que los macrófagos tienen receptores para la parte cristalina (Fc) del anticuerpo contra IgG de ratón. Para eliminar esta variable, se bloquearon estos receptores Fc con suero normal de conejo inactivado al 10%, antes de la fijación y después de la permeabilización (según el caso).

En la figura 6B se muestra el resultados de la infección de 2 hrs., al término de éste tiempo observamos que los parásitos habían interactuado con la membrana del macrófago y algunos comenzaban a ser endocitados. No se presentaron cambios en la fluorescencia de la superficie de los parásitos

que estaban adheridos a la membrana del macrófago, así como tampoco en la membrana del macrófago, la cual no mostró signos de reacción fluorescente. En este ensayo obtuvimos un mejor bloqueo de los receptores Fc del macrófago, lo cual nos permitió distinguir claramente las condiciones y posición de los antígenos de superficie marcados con los anticuerpos policlonales de ratón.

Los controles tratados con suero normal de ratón en lugar de suero antileishmania, no dieron reacción fluorescente sobre la superficie (fig 6F).

A las 5 hrs de infección, observamos que muchos parásitos ya habían entrado a los macrófagos y se encontraban en vacuolas parasitóforas, otros más estaban adheridos a la superficie del mismo. En estos experimentos observamos la superficie del parásito claramente definida, sin embargo, la reacción fue muy intensa en el núcleo del macrófago. En los macrófagos donde ya había parásitos internalizados no observamos antígenos pegados en la superficie del macrófago, ni cambios en la intensidad de la fluorescencia de los parásitos (fig 6C).

A las 24 hrs de infección, los promastigotes endocitados ya se habían diferenciado en amastigotes. Observamos un buen número de amastigotes por célula bien preservados, y entrando a fase de división celular. Estas observaciones nos indicaron que en términos generales logramos una buena infección. Como en la infección anterior, no detectamos cambios en los antígenos de superficie del parásito, ya que los anticuerpos producidos contra promastigotes seguían reconociendo las formas amastigotes intracelulares. No se observó exposición de antígenos del parásito sobre la superficie del macrófago (fig 6D).

En la infección de 48 hrs. algunos amastigotes comenzaron a destruirse

(fragmentos celulares del parásito fluorescentes), aunque también se observaron amastigotes en división celular (fig 6E). En otras células la superficie del parásito se observó punteada, pero tampoco observamos exposición de antígenos de Leishmania sobre la superficie del macrófago.

Aún llegando a este tiempo de infección, no detectamos cambios en los antígenos de la superficie del parásito, contra los cuales estaban dirigidos los anticuerpos policlonales utilizados en todas las reacciones.

III Matriz extracelular y parásitos.

1. Interacción de L. m. pifanoi con secciones de piel de ratón.

Con el objeto de determinar si Leishmania se asocia preferencialmente con algunos componentes de la matriz extracelular de la piel del huésped, o si éstos influyen en procesos biológicos del parásito (como diferenciación o proliferación) decidimos hacer interacciones "in vitro" de cortes de piel de ratón (por congelación) con leishmanias a 28 °C. Los controles de esta interacción consistieron en cortes de piel sin parásitos.

Durante las interacciones se hicieron las siguientes observaciones:

-Los parásitos tendieron a formar agregados en la superficie y contornos de los cortes de piel, dependiendo en la mayoría de los casos de la cantidad de parásitos que se encontraban en los cortes y sobre todo casi al término de la interacción.

-Aproximadamente después de 4 hrs de interacción, los parásitos adoptaron formas redondeadas con cuerpos densos en su interior. Dichas formas fueron predominantes en la mayoría de los ensayos, sin embargo, también se observaron formas ovaladas. Las formas redondeadas se observaron tanto sobre el corte como en otras regiones de la caja de cultivo.

-Entre las fibras de colágena se observaron parásitos agregados y solos, conforme avanzó el tiempo de interacción estas fibras se observaron más claras y su contorno más definido, dando la impresión de que la matriz que los rodeaba estaba siendo digerida.

A) Determinación cualitativa de GAGs en cortes de piel de ratón.

Tinción con azul alciano.

Para determinar si los parásitos estaban digiriendo algún tipo de componentes de la matriz extracelular de la piel (glicosaminoglicanos o proteoglicanos), los cortes se tiñeron con azul alciano pH 1.0 y 2.5 por 2 hrs, al término de la interacción con los parásitos.

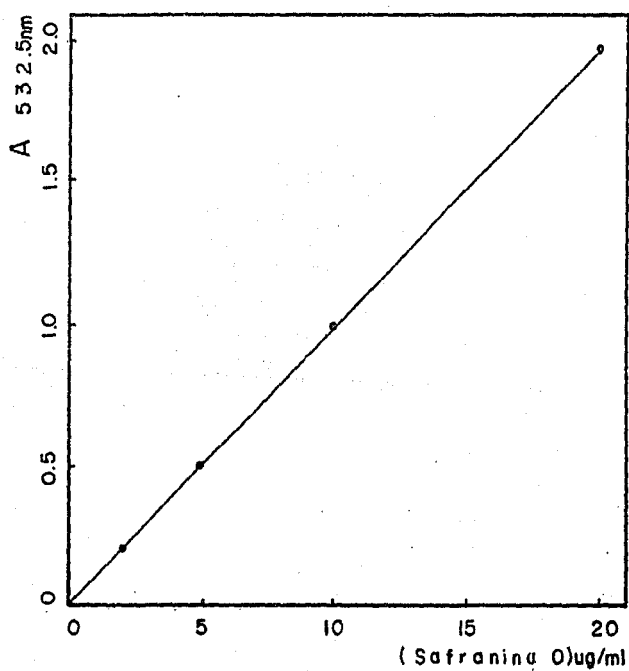
La intensidad de la coloración (azul claro) fue mayor en los controles respecto a los experimentales, donde ésta fue menor. Los ensayos fueron duplicados y se repitieron 5 veces en los cuales se obtuvo el mismo resultado.

B) Determinación cuantitativa de GAGs. Microespectrofotometría con Safranina O.

Se utilizó la Safranina O, para determinar la cantidad de GAGs en las secciones de piel de ratón. Al término de las interacciones con los parásitos, los cortes se tiñeron con safranina y después por espectrofotometría, se midió la cantidad de colorante que se unió a los GAGs por cada corte, y este valor se transformó a concentración de colorante en $\mu\text{g/ml}$, con una curva estandar de Safranina (Gráfica 1). Los valores obtenidos se registraron en la Tabla 3.

GRAFICA I

CURVA ESTANDAR DE SAFRANINA 0



$$m = 0.0972$$

$$b = 0.049$$

TABLA 3

INTERACCIONES ENTRE SECCIONES DE PIEL Y PROMASTIGOTES DE
L. mexicana.

TIEMPO (hr)	CONCENTRACION DE SAFRANINA O ($\mu\text{g/ml}$)		
	CONTROL	EXPERIMENTAL	%REDUCCION
3	1.13 [†]	0.56	50
6	1.05 [‡]	0.57	46
6	0.90 [‡]	0.66	27
6	0.48 [‡]	0.20	58
24	0.67 [†]	0.10	85
24	0.88 [†]	0.18	70

†promedio de 5 secciones de piel

‡promedio de 6 secciones de piel

‡promedio de 3 secciones de piel

†Este control consistió en medio de cultivo donde crecieron los parásitos.

GAGs= glicosaminoglicanos medidos indirectamente con la Safranina

Durante las interacciones realizadas para estas determinaciones con Safranina O, observamos cuerpos densos en el citoplasma de los parásitos y la aparente degradación de la matriz que rodea las fibras de colágena. Los parásitos se conservaron en buenas condiciones durante las interacciones.

De acuerdo a los resultados de la tabla 3, se observó una drástica reducción en la cantidad de GAGs de las secciones de piel incubadas con parásitos. En las interacciones de 3 y 6 hrs., se encontró un 50% de reducción y en las de 24 hrs, hasta cerca de un 80% de remoción de éstos componentes. Estos ensayos indicaron que los promastigotes de L. mexicana degradaron estos componentes extracelulares.

2. Interacción de promastigotes de L. m. pifanoi con geles de colágena I.

Con el propósito de conocer si existe alguna asociación de los parásitos con un componente de la matriz extracelular aislado, la colágena I de tendón de cola de rata, o si ésta influye en procesos de proliferación y/o diferenciación de Leishmania, así como si ésta última degrada la colágena, como sugiere Ridley y cols(1983), durante la infección, se hicieron ensayos de interacción "in vitro" de promastigotes con geles de colágena como sustrato.

A) Geles de colágena tipo I.

Los geles de colágena I obtenidos, mostraron una consistencia y transparencia adecuada, y la polimerización fue rápida; aproximadamente después de incubar 15 minutos a 37°C.

En la Gráfica 2 y 3 se muestran las curvas standard de colágena I, que se elaboraron para determinar la concentración de colágena por μ l de solución, utilizando la técnica de tinción con rojo sirio 0.1%, y midiéndolo por espectrofotometría a 530nm (equivalencia proporcionada por J.L.Rosales), para determinar la concentración de colágena por μ l de solución.

B) Ensayo de interacción de promastigotes con un gel de colágena I, en pozos de una caja para Elisa.

Se realizaron dos tipos de ensayos. En el primer experimento se tomó

2. Interacción de promastigotes de L. m. pifanoi con geles de colágena I.

Con el propósito de conocer si existe alguna asociación de los parásitos con un componente de la matriz extracelular aislado, la colágena I de tendón de cola de rata, o si ésta influye en procesos de proliferación y/o diferenciación de Leishmania, así como si ésta última degrada la colágena, como sugiere Ridley y cols (1983), durante la infección, se hicieron ensayos de interacción "in vitro" de promastigotes con geles de colágena como sustrato.

A) Geles de colágena tipo I.

Los geles de colágena I obtenidos, mostraron una consistencia y transparencia adecuada, y la polimerización fue rápida; aproximadamente después de incubar 15 minutos a 37°C.

En la Gráfica 2 y 3 se muestran las curvas standard de colágena I, que se elaboraron para determinar la concentración de colágena por μ l de solución, utilizando la técnica de tinción con rojo sirio 0.1%, y midiéndolo por espectrofotometría a 530nm (equivalencia proporcionada por J.L.Rosales), para determinar la concentración de colágena por μ l de solución.

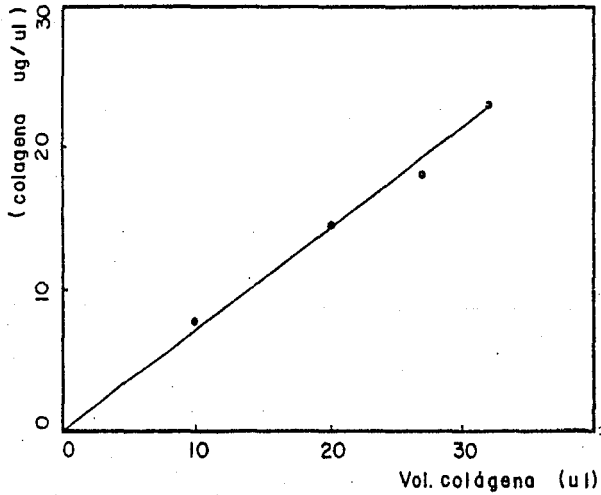
B) Ensayo de interacción de promastigotes con un gel de colágena I, en pozos de una caja para Elisa.

Se realizaron dos tipos de ensayos. En el primer experimento se tomó como variable la cantidad de parásitos y la constante fue el volumen del gel de colágena (15 μ l/pozo). Las cantidades de parásitos adicionadas fueron 1×10^4 , 8×10^4 , 6×10^4 , 4×10^4 y 2×10^4 . En el 2o. ensayo variamos el volumen del gel de colágena y la constante fue la cantidad de parásitos (1×10^4), para eliminar la posibilidad de que a una cierta concentración de colágena, la acción del parásito sobre este componente estuviera siendo inhibida. En

GRAFICA 2

CURVA ESTANDAR DE COLAGENA

(1)

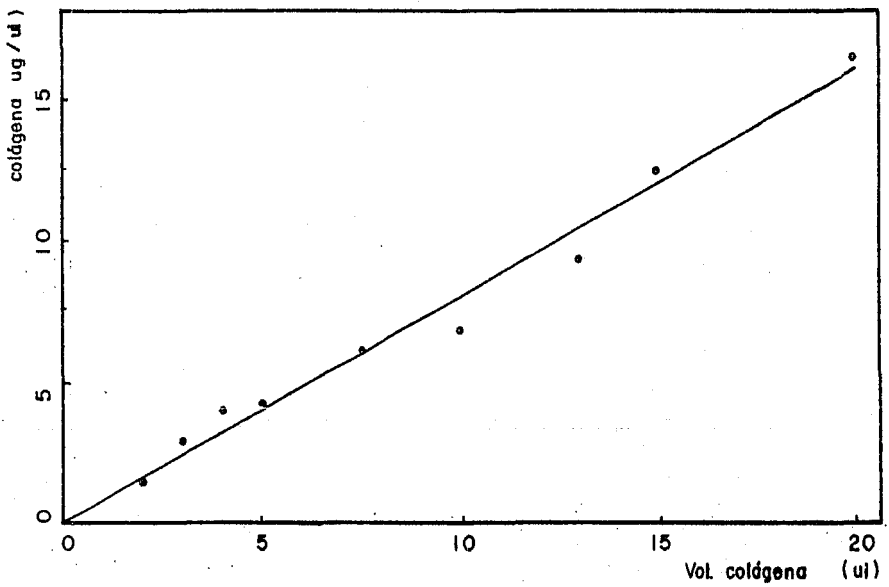
 $m = 0.759$ $b = 0.26$

1.0 ug/ul de colagena

GRAFICA 3

CURVA ESTANDAR DE COLAGENA

(2)



$$m = 0.792$$

$$b = 0.0148$$

0.8 ug/ul de colágena

ambos casos los controles consistieron en geles sin parásitos. La interacción fue por 48 hrs a 27°C.

Después de la interacción los geles se tñieron con rojo sirio y se procesaron para determinar la concentración de colágena por muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Los datos son promedios de duplicados.

TABLA 4
EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PARASITOS
SOBRE COLAGENA I.

CONCENTRACION DE COLAGENA ($\mu\text{g/gel}$)		
CONTROL ¹	10.6	
PARASITOS*	REDUCCION(μg)	
1x10 ⁶	9.9	0.70
8x10 ⁶	9.67	0.93
6x10 ⁶	9.67	0.93
4x10 ⁶	8.87	1.73

¹ Control: gel de colágena de 15 μl (constante).

* Interacción de gel de colágena de volumen contante(15 μl).

En la tabla 4 se observó, que donde interaccionaron 6 y 8x10⁶ parásitos, la concentración de colágena disminuyó en aproximadamente 1 μg , mientras que los geles incubados con 4 x 10⁶ parásitos mostraron una reducción mayor, de 1.73 μg . Estos resultados sugieren que la colágena puede ser degradada por los parásitos, aún y cuando no se observan diferencias

uniformes a diferentes concentraciones de parásitos.

Cabe aclarar que en estos datos se calculó un factor de corrección aproximado, debido a que se observó que los parásitos absorbían colorante y una gran cantidad de ellos se quedaban adheridos a los geles, aún después de los lavados. Se pensó que quizás no observábamos diferencias evidentes debido a la cantidad de colorante que se unía a los parásitos. Se tomaron 1×10^6 parásitos, se tiñeron con rojo sirio, después se extrajo el colorante y se midió su absorbancia a 530 nm. Este dato se transformó a equivalente de concentración de colágena y se restó a los datos obtenidos en este ensayo.

Los resultados del 2o. ensayo, donde la variable fue el volumen del gel de colágena la cantidad de parásitos permaneció constante, se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5
EFECTO DE PARASITOS (1×10^6) SOBRE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE COLAGENA I.

VOLUMEN DE GEL COLAGENA I (μ l)	CONCENTRACION DE COLAGENA I (μ g)		
	CONTROL	EXPERIMENTAL	REDUCCION (μ g) ^L
10	8.2	4.3 ^J	3.9
15	9.6	8.5	1.1
20	12.86	12.9	0
25	16.74	13.0	3.7
30	18.46	17.2	1.2

^JCorrección, se restó 1 μ g a cada uno de los datos obtenidos, debido a la cantidad de colorante que absorbían 1×10^6 parásitos. ^LLa concentración del gel experimental se le restó a la del control.

En este ensayo (Tabla 5), se observa una reducción de material similar al del caso anterior, sólo para geles de 9.6 µg, esto es de 1 µg. Para los geles de 10 y 25 µl la remoción fue mayor, sin embargo, no existe uniformidad en los datos obtenidos. Al parecer la remoción de material fue muy irregular. Estas diferencias pueden ser atribuidas a pérdida indeterminada de colágena durante el proceso de lavado o tinción del gel.

C) Interacción de L. m. pifanoi con colágena I utilizando medio de cultivo (MEM) con y sin suero fetal bovino.

Se conoce que algunos factores del suero tienen acción inhibitoria de enzimas y específicamente de algunas proteasas (81). Para descartar la posibilidad de que los factores del suero estuvieran inhibiendo la acción de alguna proteasa del parásito, se llevaron a cabo los ensayos de interacción con colágena en presencia y ausencia de suero fetal bovino. Ambas condiciones se ensayaron con sus respectivos controles. Los resultados se resumen en la Tabla 6. Los datos para cada caso son promedio de duplicados.

TABLA 6

EFFECTO DE PARASITOS (1×10^6) SOBRE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLAGENA I, CON Y SIN SUERO FETAL BOVINO.

VOLUMEN DE COLAGENA I (μ l)	SIN SUERO		R*	CON 10% DE SFB		R
	CONTROL	EXPERIMENTAL (μ g)		CONTROL	EXPERIMENTAL (μ g)	
2.5	2.56	2.22	0.36	2.99	4.56	-
5.0	4.31	4.43	0	9.12	8.98	0.14
7.5	8.59	5.98	2.61	10.36	9.59	0.77
10.0	8.07	7.23	0.84	13.94	12.70	1.24
15.0	-	-	-	15.44	14.03	1.41

R* Reducción

Todos los valores son promedios de duplicados.

Analizando la tabla 6, observamos una disminución de aproximadamente 1 μ g en geles de 10 y 15 μ l que se incubaron con suero, mientras que los incubados sin suero presentan reducciones muy irregulares y que no muestran con claridad si existe degradación de colágena.

Los resultados anteriores nos indicaron que cuando menos bajo estas condiciones, los promastigotes degradan colágena I en cerca de 1 μ g. Las diferencias observadas en ausencia de suero pueden atribuirse a otro factor.

Durante la interacción de leishmanias con el sustrato de colágena I, observamos una asociación de los parásitos con las fibras de colágena. Al parecer esta asociación era muy fuerte puesto que aún después de varios lavados, los agregados de parásitos no se extrajeron.

Para corroborar si la colágena influye en procesos celulares del parásito tales como proliferación, se hizo un control de parásitos en medio de cultivo, sin colágena, que nos permitió comparar el crecimiento de éstas respecto a las leishmanias incubadas en presencia de colágena.

En el transcurso de las interacciones, los promastigotes proliferaron en presencia y en ausencia de suero, aunque con el suero el crecimiento fue mayor. Sin embargo, no se observaron diferencias entre el crecimiento de parásitos incubados con colágena respecto a los controles. Tampoco se observó que la colágena indujera (durante este período de incubación), cambios en la diferenciación del parásito (promastigote-amastigote), ya que cuando los parásitos alcanzaron la confluencia, se observaron flagelados y agregados.

FIGURA 1.

- A) Fotomicrografía de barrido de promastigotes de L. mexicana en cultivos axénicos.
- B) Fotomicrografía de transmisión de promastigotes de Leishmania.
- C) Fotomicrografía de barrido de un macrófago infectado con amastigotes, en condiciones "in vitro".
- D) Fotomicrografía de transmisión de amastigotes de L. mexicana.

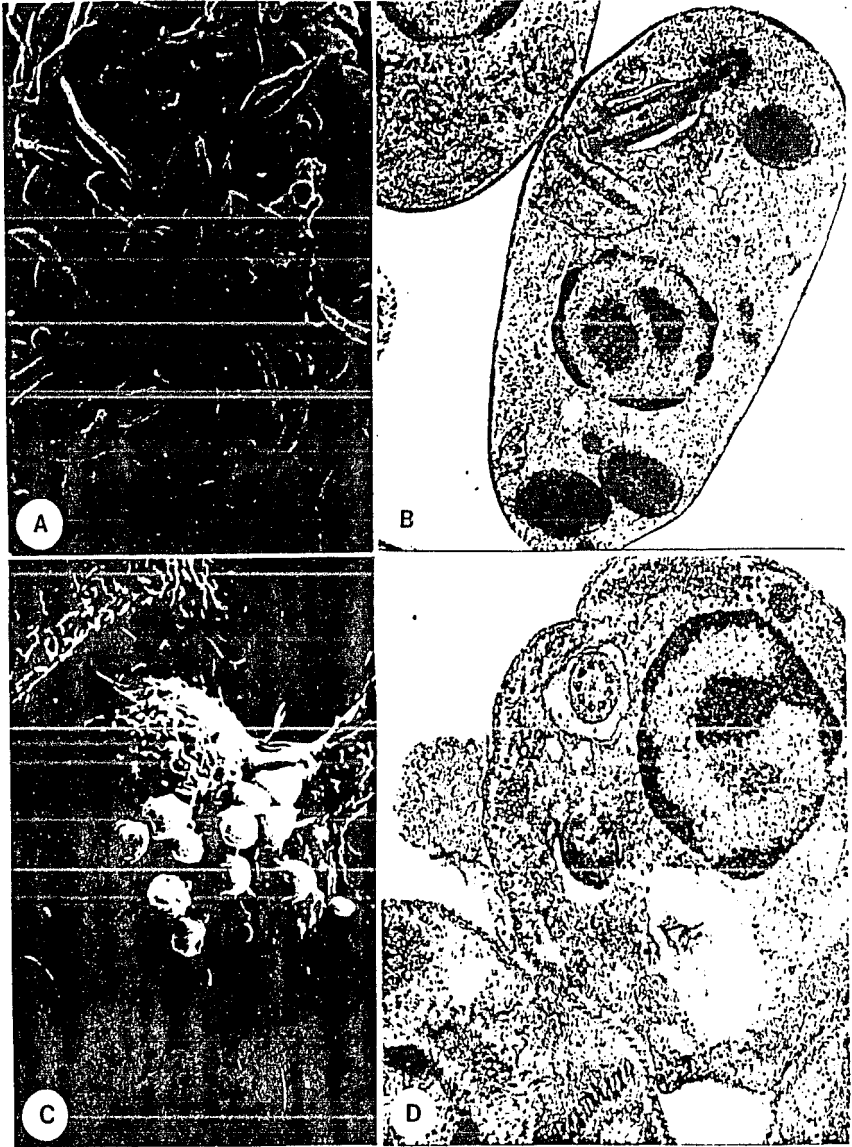


FIGURA 1

FIGURA 2

- A) Corte transversal de piel normal de hámster (Control).
- B) Piel de una extremidad posterior de hámster infectado con Leishmania.
Infección de 2 meses. 20 X. Observe el tejido vacuolado y laxo.
- C) Piel de hámster infectada. 40 X



FIGURA 2

FIGURA 3

- A) Corte transversal a la epidermis de una extremidad posterior de ratón BALB/c (Control). 10 X
- B) Piel de ratón infectada con Leishmania, 12 días de infección. 20 X. Se observan macrófagos infectados con amastigotes.
- C) Piel de ratón con 12 días de infección, 40 X. Acercamiento de la dermis, donde se encuentran las células infectadas.
- D) Fotomicrografía de transmisión de un macrófago de piel infectado con amastigotes de Leishmania.

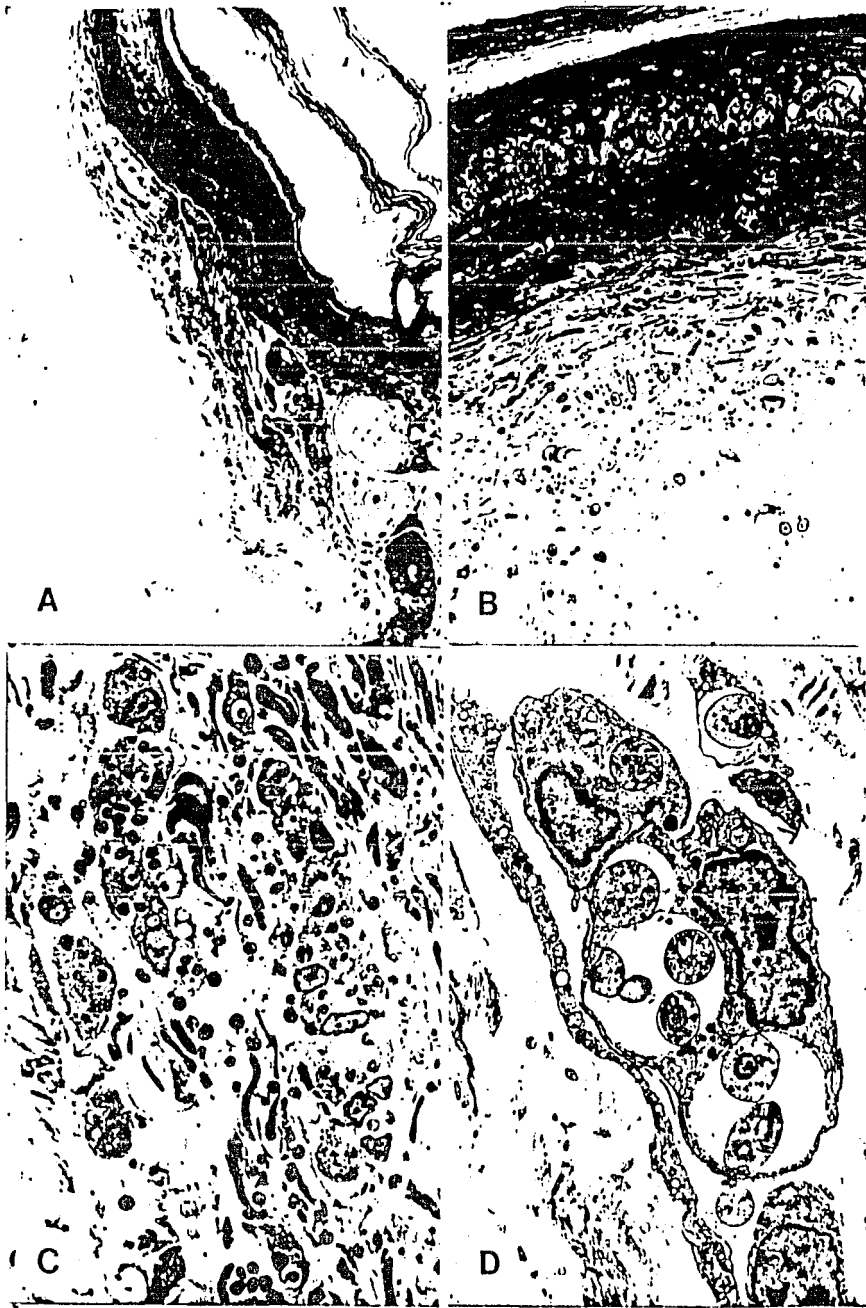


FIGURA 3

FIGURA 4

- A) Corte de piel de ratón con 8 meses de infección, 20 X.
- B) Infección de 8 meses, 40X
- C) Zona inferior de la dermis, infección 8 meses, se observa una gran cantidad de amastigotes.40 X
- D) Fotomicrografía de transmisión de amastigotes extracelulares.



FIGURA 4

FIGURA 5

- A) y B) Infección "in vitro" de macrófagos peritoneales de ratón con Leishmania, tinción con GIEMSA. 40 y 100 X.
- C) Promastigotes de Leishmania aglutinados con Con A-FITC.
- D) Infección de macrófagos peritoneales con leishmanias, 2 hrs de infección.
Reacción con Concanavalina A conjugada con FITC.

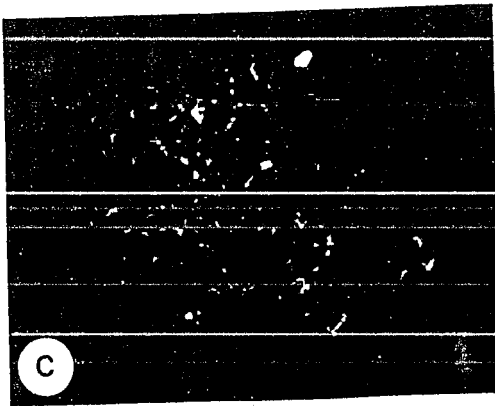


FIGURA 5

FIGURA 6

Macrófagos peritoneales infectados con leishmanias. Los antígenos de superficie del parásito se marcaron con anticuerpos policlonales y fluoresceína, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

- A) Promastigotes de Leishmania marcados con antisuero antileishmania producido en ratón.
- B) Infección "in vitro" de 2 hrs. Los promastigotes se encuentran adheridos a la membrana del macrófago.
- C) Infección de 5 hrs. Se observan los parásitos ya endocitados por el macrófago.
- D) Infección de 24 hrs. Los amastigotes ya diferenciados, comienzan a dividirse.
- E) Infección de 48 hrs. Los parásitos intracelulares se observan todavía en condiciones adecuadas.
- F) Control, las células se trataron con suero de ratón preinmune.

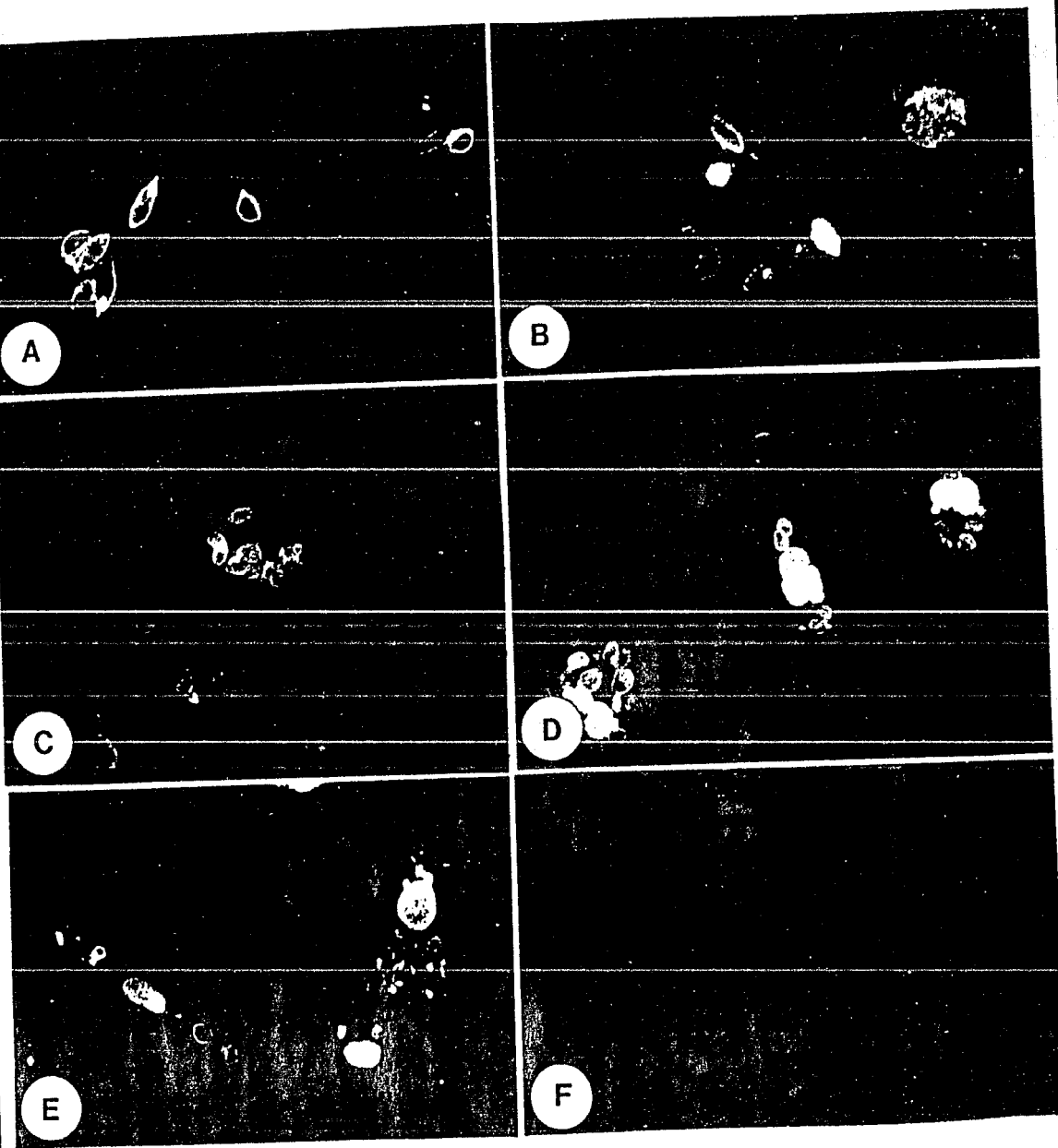


FIGURA 6

FIGURA 7

- A) Fotomicrografía de transmisión de Promastigotes de *L. mexicana* tratados con ferritina catiónica. Los granos de este colorante se observan sobre la membrana celular.
- B) Fotomicrografía de transmisión de Amastigotes tratados con ferritina catiónica. Obsérvese la doble membrana de la vacuola parasitófora de los macrófagos cubriendo la del parásito.



FIGURA 7

DISCUSION.

Actualmente, las Leishmaniasis continúan siendo enfermedades de gran importancia en algunas regiones del mundo. Los eventos que ocurren durante la interacción inicial entre parásitos y células blanco, en la piel del huésped (microambiente donde los promastigotes son inoculados), no han sido completamente esclarecidos.

En el presente trabajo, nuestro interés consistió en establecer si Leishmania interactúa con componentes de la matriz extracelular de la piel y determinar si interviene en procesos de degradación de esta matriz, durante el transcurso de la infección.

Interacción Leishmania-Macrófago "in vivo".

Es importante establecer las condiciones de infección "in vivo" con animales de laboratorio de la cepa de Leishmania con la cual se realizan los estudios experimentales, ya que esto nos permite y facilita la correlación de los estudios realizados "in vitro".

Respecto a las lesiones producidas en las extremidades inferiores de los hamsters con promastigotes y amastigotes de L. m. pifanoi, se observó el crecimiento gradual de éstas durante los dos primeros meses, como resultado de los granulomas producidos por una gran cantidad de macrófagos infectados con amastigotes en la piel del huésped. Estas características se detectaron en el microscopio óptico, así como también el daño en tejido conjuntivo de la dermis y especialmente en las fibras de colágena (Fig 2), las cuales parecen haber sido removidas casi completamente a este tiempo de infección, como ya ha sido observado en otros estudios realizados tanto en

tejidos humanos como en animales. Posteriormente las extremidades de los animales infectados siguen inflamándose provocando la deformación de las mismas.

Algunos autores han observado amastigotes intracelulares, unidos a un sitio específico de la membrana de la vacuola parasitófora que los contiene. Se ha sugerido que estos contactos celulares sirven para el intercambio de nutrientes de los parásitos, sin embargo, no es una función demostrada (11). Nosotros observamos que en los tejidos de ratones BALB/c infectados con Leishmania, se encontraban algunos amastigotes libres y otros unidos a la membrana de la vacuola (fig 3D).

Diferenciación de formas amastigote a promastigote.

La diferenciación de formas amastigotes a promastigotes ocurre en la naturaleza, cuando un insecto vector ingiere amastigotes de un huésped vertebrado infectado. Un proceso similar ocurre en condiciones "in vitro" cuando los amastigotes obtenidos de animales experimentales infectados, son inoculados en medio de cultivo a 26°C.

El aislamiento de amastigotes de animales infectados ha sido utilizado para estudios biológicos, inmunológicos y bioquímicos. La infección producida en los hámsteres nos permitió extraer periódicamente esta forma del parásito, y mediante la transferencia a un medio de cultivo a 28°C, observar su diferenciación a forma promastigote. De esta manera fue posible conocer el comportamiento del parásito en las dos fases de su ciclo de vida: amastigote y promastigote, y mantener las formas flageladas en cultivos axénicos para la realización de los experimentos, así como asegurar que los organismos utilizados en los ensayos eran virulentos (capaces de desarrollar

infección).

Infección en ratón Balb/c.

La infección en ratones Balb/c se ha utilizado para realizar estudios acerca de la infectividad de Leishmania, debido a la susceptibilidad a infecciones de leishmaniasis cutánea y visceral.

Pérez et al (1979), reportó la susceptibilidad de ratón Balb/c para L. mexicana donde aproximadamente a la 2a. semana después de la inoculación de amastigotes extraídos de hámsteres, se detectó un nódulo en el sitio de inoculación. Estas lesiones se incrementaron en tamaño gradualmente hasta provocar metastasis y ulceración de las mismas. También se han reportado lesiones crónicas que resultan en la pérdida de la pata infectada (67,68).

Los ratones inoculados con leishmanias, no mostraron lesiones durante los primeros días sin embargo, 12 días después de la inoculación, se observaron los parásitos en cortes histológicos.

Después de éste tiempo los ratones tienden a recuperarse de la infección, y hasta el 2o. mes observamos la piel en condiciones casi normales. Aproximadamente 8 meses después, la infección se expresó en el ratón que se conservó para observación. Este animal presentó inflamación en las extremidades posteriores, y en los cortes semifinos se observó una gran cantidad de macrófagos infectados con amastigotes (fig 4). Una característica interesante de ésta infección fue encontrar en la parte inferior de la dermis amastigotes extracelulares, que se observaron bien preservados en el microscopio electrónico (fig 4D), aunque algunos de ellos se encontraron deteriorados. Andrade et al (1984) y Ridley (1980), han observado amastigotes extracelulares en infecciones en el hombre y en

animales de experimentación. Su presencia ha sido atribuida a la liberación de éstos cuando los macrófagos se lisan, y debido a eso en las muestras sólo se observan algunos mal preservados.

El cuadro expresado en el ratón de 8 meses de infección, podría explicarse suponiendo que se tratase de una población de amastigotes que tuvieran la capacidad de proliferar extracelularmente, y que esto fuera determinado por el medio ambiente (matriz extracelular) y otros factores genéticos. Las diferencias observadas en la infección con ratones Balb/c pueden atribuirse a la susceptibilidad individual la cepa de Leishmania utilizada, a las condiciones fisiológicas de los ratones empleados, o que también el parásito atravesara por un periodo de "latencia", y por ello detectar la infección 8 meses después. De hecho, algunos casos clínicos de pacientes con Leishmaniasis presentan reincidencias de la enfermedad después de algunos años.

Estas observaciones y la dificultad de seguir el curso de la infección "in vivo" en los primeros momentos, nos condujo a buscar un método que nos permitiera observar la interacción inicial del parásito con componentes de matriz extracelular en condiciones "in vitro" y de esta forma, determinar cuantitativamente los cambios graduales en colágena y demás componentes de la matriz, así como determinar la participación del parásito en este proceso.

Matriz extracelular y parásitos.

Interacción de secciones de piel de ratón con leishmanias.

Las relaciones entre matriz extracelular y las leishmanias no han sido estudiadas adecuadamente, a pesar de ser este el medio ambiente en el cual se desarrolla la interacción inicial huésped-parásito. Respecto a este as-

pecto de las Leishmaniasis, tampoco se han utilizado sistemas "in vitro", semejantes al desarrollado en el presente estudio, con secciones de piel de ratón de un determinado espesor, adheridos a cubreobjetos y sobre los cuales se realizaron las interacciones con promastigotes de cultivos axénicos.

Este sistema nos permitió seguir el curso de la interacción desde sus momentos iniciales, utilizando un microscopio invertido con contraste de fases y determinando en términos generales, como interactúa el parásito con componentes de matriz extracelular de la piel del huésped vertebrado. Después de observar que parecía existir una degradación de la matriz que rodea las fibras de colágena, matriz que esta constituida principalmente por glicosaminoglicanos, decidimos utilizar colorantes específicos para estas moléculas que nos permitieran evidenciar ópticamente estos grupos, y que nos ayudaran a determinar si estaban siendo removidos durante la interacción con los parásitos.

Con el azul alciano y la Safranina O, se determinó cualitativa y cuantitativamente, respectivamente la cantidad de GAGs y proteoglicanos presentes en cada sección de piel de ratón, mediante comparaciones entre los controles con las secciones de piel que habían interactuado con los parásitos.

Los resultados obtenidos durante este ensayo (Tabla 3), sugieren claramente que los GAGs (ácido hialurónico) y proteoglicanos (condroitin sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, keratán sulfato) presentes en la piel del huésped, son degradados por Leishmania. Estos datos apoyan la hipótesis de la participación directa del parásito en la remoción de estos componentes de matriz extracelular, durante el proceso de infección (Fig 2).

Otros datos experimentales que apoyan estos resultados, es que

actualmente se descubrió la actividad de proteasa de una glicoproteína de superficie celular del parásito (13), la cual ha sido implicada en la virulencia de Leishmania, y esto hace suponer que muy posiblemente el parásito posea otras proteinasas de superficie celular que sean las responsables, en parte, de la degradación de éstos componentes.

Es necesario realizar estudios más profundos, con cada uno de los GAGs y proteoglicanos que integran la matriz, para determinar si existe especificidad por alguno de ellos, o si la degradación es indiscriminada, y si esta función es relevante en el mecanismo de infección.

Interacción del Leishmanias con colágena I.

Las interacciones de promastigotes de L. m. pifanoi con geles de colágena I, se realizaron con la finalidad de conocer si el parásito interactúa específicamente con este componente de matriz extracelular, y tratar de esclarecer si influye en procesos de diferenciación celular. En las infecciones de ratón Balb/c, se observó la presencia de amastigotes extracelulares. Esta observación conduce a preguntarse si los promastigotes tienen la capacidad de diferenciarse extracelularmente, y si este evento es promovido por componentes de matriz como la colágena.

Otro interés que nos condujo a realizar estas interacciones, fue determinar la participación de Leishmania en procesos de remoción de la colágena en tejidos infectados (hombre y animales experimentales, fig 2, 3 y 4).

La metodología de unión de rojo sirio a componentes específicos de matriz, nos permitió medir la concentración de GAGs y proteoglicanos y establecer las comparaciones entre geles control y geles que interaccionaron con los promastigotes.

Como hipótesis inicial supusimos que si el parásito es el responsable directo de la degradación de colágena, debería presentar actividad de proteasa. Para resolver esta pregunta realizamos 3 tipos de ensayos diferentes; en el primero utilizamos cantidades diferentes de parásitos y mantuvimos constante la concentración de colágena por gel (tabla 4), encontrando una reducción del contenido de colágena de aproximadamente 1 μg /muestra en geles que habían interactuado con parásitos, respecto a los controles. El gel incubado con 4×10^5 parásitos presentó una reducción de 1.73 μg .

Debido a que no encontramos proporcionalidad en estos resultados y pensando en la posibilidad de que a cierta concentración de colágena, el efecto de digestión estuviera siendo inhibido, decidimos mantener en los siguientes experimentos la cantidad de parásitos constante y variar el volumen del gel de colágena. En esta condición se realizó el 2o. ensayo.

En la tabla 5, observamos nuevamente una reducción de aproximadamente 1 μg en geles de 10 μl , resultado que sugería la degradación de colágena por los parásitos.

Las colagenasas son proteinasas neutrales específicas que inician la ruptura de fibras de colágena nativas en un sitio único. Se ha determinado que la presencia de SFB en el medio de cultivo de células que poseen esta enzima (p.ejem. Entamoeba histolytica, 64), enmascara la actividad de colagenasa e inhibe la acción enzimática (81). También se ha demostrado que un inhibidor de la colagenasa en el suero es la α_2 -macroglobulina (80).

El 3er. ensayo se realizó para descartar esta variable, ya que los experimentos anteriores se realizaron en presencia de 10% de SFB. Se hicieron las interacciones en las mismas condiciones que las anteriores pero en presencia y ausencia de SFB. En la Tabla 6 observamos que en presencia

de suero, hay una reducción promedio de 1 μg , en geles experimentales, en geles de 7.5, 10 y 15 μl , mientras que en la otra condición encontramos una ligera disminución en los geles de 2.5 μl . de 0.3 μg y en los de 7.5 y 10.0, una disminución semejante a las anteriores de 1 μg .

Estos resultados muestran la degradación de la colágena I por promastigotes de L. m. pifanoi, sin embargo, se observó que el suero no estaba afectando la acción de la proteinasa, sino que de alguna manera provocaba una retención mayor de colorante en los geles. En presencia de suero la cantidad de colorante retenido en el gel se incrementó comparado con el control tratado sin suero.

La observación anterior puede atribuirse a la interacción de la colágena con ciertas proteínas del suero, como es el caso de la fibronectina, que posiblemente se esté asociando con las moléculas de colágena, y den como resultado la modificación de las propiedades de unión del colorante. De acuerdo a lo anterior, no detectamos que en ausencia de suero, la acción degradativa de Leishmania establecida en los otros ensayos, fuera incrementada.

Como se mencionó en los ensayos con secciones de piel de ratón, se ha descrito la actividad de proteasa de una glicoproteína de superficie de promastigotes de L. mexicana, la gp63 KD (13), y que en un estudio donde se utilizó como sustrato la albúmina de suero bovino, con 12×10^8 parásitos, se encontró una degradación del orden de aproximadamente 1 μg (30). Entonces es fácil suponer, que si Leishmania presenta estas características, los datos obtenidos durante este estudio no están muy alejados de lo que ocurre en la naturaleza, y que apoyen la hipótesis de que el parásito actúe directamente sobre componentes de matriz extracelular, resultando finalmente

en la destrucción de tejido del huésped que parasita.

Sin embargo, se debe considerar también la posible participación de los macrófagos en estos eventos. Se ha descrito que los macrófagos peritoneales de cuyo activados secretan una colagenasa en condiciones "in vitro" (81). La colagenasa es una clase de proteinasa neutral inducible, por medio de la cual los macrófagos activados pueden modificar su medio ambiente extracelular. En casos clínicos como "la úlcera de los chicleiros", donde ocurre la destrucción de cartilago de oreja, se han detectado parásitos en cantidades mínimas, lo que hace suponer que la acción directa del mismo no desarrolla un papel primordial, sino que quizás los macrófagos, presentes en grandes cantidades, sean los responsables directos de la remoción de matriz extracelular, como una respuesta de autoinmunidad.

La posibilidad de que el parásito sea el responsable directo de los daños producidos en tejido conjuntivo, no elimina la posible participación de los macrófagos en este proceso. Quizás ambas células sean las responsables de la degradación de estos componentes, aunque en algunos casos o en determinadas etapas la acción de una de ellas pueda ser la predominante, o sea el resultado de otros procesos. La realización de ensayos "in vitro" e "in vivo", sobre la participación de estas células en este proceso, conducirá a conocer las causas de la patología de la Leishmaniasis cutánea.

Carga superficial del parásito.

Uno de las interrogantes inicialmente planteadas fue determinar si la colágena influye en procesos de diferenciación de promastigote a amastigote. Debido a que durante la interacción colágena-parásitos, no observamos cambios morfológicos que indicaran que éste último se diferenciara en

presencia de este componente, hicimos determinaciones de carga de superficie, midiendo la movilidad electroforética (m.e.) de los parásitos, en un aparato de electrofóresis celular. Esta metodología se utilizó como criterio para establecer si la interacción con la colágena influía en propiedades de superficie del parásito.

Se hicieron las mediciones de promastigotes cultivados en un sustrato de colágena I, y las comparamos con las realizadas con promastigotes de cultivos axénicos de diferente número de resiembras. Esto nos permitió determinar que las características de superficie del promastigote cambian cuando son cultivados en presencia de colágena I.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) demuestran que existen diferencias en los grupos aniónicos que constituyen la membrana celular de ambos estados de Leishmania, ya que los promastigotes presentan una carga negativa más alta que los amastigotes, esto ya ha sido reportado para otras especies de L. mexicana (50,69).

También encontramos que los promastigotes cultivados sobre sustrato de colágena I, presentan una carga negativa más alta que los promastigotes de cultivos axénicos de XVI y XVIII resiembras. Esta diferencia de carga neta está determinada muy posiblemente por algún cambio en los grupos aniónicos de la membrana del parásito, inducido por la colágena. Quizás se estén adicionando grupos de carga negativa a la membrana del parásito, o se este induciendo la síntesis de determinados componentes del mismo que le estén confiriendo el aumento de carga superficial a Leishmania, y que reflejen a la vez el inicio de otros procesos biológicos del parásito.

La citoquímica ultraestructural (tinción con colorantes catiónicos para microscopia electrónica) y la medición de la carga superficial por

microelectroforesis celular, son utilizadas como herramientas de alta resolución en el análisis de las propiedades de superficie de las células eucariontes. En el presente trabajo, la medición de la movilidad electroforética nos permitió observar las diferencias de carga entre promastigotes y amastigotes de Leishmania, así como para conocer si los componentes de matriz extracelular (como es el caso de la colágena) alteran o cambian alguna característica de la superficie celular del parásito.

Pruebas de aglutinación con lectinas.

Los ensayos realizados con diferentes lectinas nos permitieron conocer en forma general, las características de aglutinación de la cepa de Leishmania mantenida en cultivos axénicos en el laboratorio. La única lectina que aglutinó y marcó la superficie de los promastigotes de L. B. pifanoi fue la Concanavalina A conjugada con FITC (fig 5C). Esto nos dió una clara indicación de que esta lectina utilizada evidenció los grupos antigénicos que contienen residuos de manosa y glucosa expuestos sobre la superficie del parásito.

Las lectinas han sido utilizadas para caracterizar la membrana plasmática de muchos tipos celulares, así como para identificar y separar poblaciones celulares y cepas de Leishmania (51). Tomando en consideración este criterio además de otras características de la cepa utilizada, como son la región geográfica de donde fue aislada, y el cuadro clínico que presentó el paciente (Leishmaniasis cutánea difusa), comprobamos que la denominada L. mexicana pifanoi, pertenece al complejo Leishmania mexicana. Es así como el empleo de lectinas es útil como herramienta taxnómica cuando no se cuentan con características morfológicas distintivas entre diferentes especies de un

organismo, como es el caso de Leishmania.

Estos ensayos también fueron útiles para encontrar un marcador de la superficie del parásito, que fue empleado para seguir el curso de los antígenos de superficie durante los procesos iniciales de la infección con macrófagos.

Infección de macrófagos peritoneales de ratón con leishmanias.

El establecimiento de las condiciones "in vitro" para la infección de macrófagos peritoneales de ratón con leishmanias (fig 5A y B), que ya ha sido reportado para la mayoría de las especies de Leishmania, nos permitieron estudiar el curso de los antígenos de la superficie del parásito durante la endocitosis por el macrófago. Sin embargo, la utilización de Con A-FITC, no fue útil para observar si los antígenos del parásito cambiaban, o quedaban adheridos a la superficie del macrófago, ya que como se muestra en la fig 5D, a pesar del bloqueo de los receptores del macrófago para esta lectina, ambas superficies celulares se marcaron.

Suero antileishmania.

La utilización de anticuerpos policlonales para la localización de los antígenos de superficie del parásito (inmunofluorescencia indirecta), fue muy útil ya que permitió determinar que en las infecciones realizadas "in vitro", dichos antígenos, que evidenciaron los anticuerpos producidos, no cambian durante la endocitosis del parásito, ni son integrados o quedan unidos a la superficie del macrófago (fig 6).

Tampoco se observaron cambios cuando el parásito se diferenció a forma amastigote, ya que los anticuerpos seguían reconociendo estas formas casi

con la misma intensidad con la que reconocían a los promastigotes.

Otro autor (41) que utilizó suero antileishmania en infecciones "in vitro" con macrófagos, sugirió que el macrófago procesaba antígenos solubles de los parásitos intracelulares y los presentaba sobre su superficie, contribuyendo de esta manera a la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, utilizando suero antileishmania producido en ratones después de 24 y hasta las 48 hrs, no observamos exposición de antígenos del parásito sobre la membrana del macrófago, aún y cuando a las 48hrs, comienzan a ser destruidos algunos parásitos intracelulares. Como puede observarse en la fig 6E, fragmentos fluorescentes dentro de las vacuolas parasitoforas.

Los resultados obtenidos en estos ensayos sugieren que probablemente no existe incorporación de antígenos de la superficie del parásito en la membrana del macrófago durante la endocitosis. Los eventos subsecuentes o dependientes de la endocitosis, tales como diferenciación y sobrevivencia intracelular de Leishmania, podrían estar determinados por otros factores, como los medioambientales, que por medio de señales u otros mecanismos le confieran finalmente al parásito la capacidad de sobrevivir y desarrollarse dentro de los fagocitos del huésped.

No obstante, cabe la posibilidad de que los cambios ocurridos en la superficie del parásito sean muy pequeños, por ejemplo que solo se presenten en algunas de las moléculas antigénicas, y que el sistema empleado en el presente estudio no haya sido capaz de resolverlo. Para confirmar cualquiera de las dos hipótesis planteadas anteriormente, es necesario realizar ensayos más finos como son los de inmunodetección, mediante técnicas de inmunocitoquímica a nivel ultraestructural, que amplifiquen el marcaje de los antígenos estudiados.

CONCLUSIONES.

1. Se establecieron las condiciones de cultivo axénico para la cepa de L. m. pifanoi, y se observó el comportamiento del parásito en las dos formas de su ciclo de vida: promastigotes y amastigotes extraídos de hámster infectado.
2. En condiciones "in vitro", se observó la diferenciación de promastigote a amastigote, y la de formas amastigotes extraídas de hámster infectado en promastigotes de cultivos axénicos.
3. Se observó la degradación de componentes de matriz extracelular en condiciones "in vivo", en tejidos de hámster y ratón Balb/c infectados experimentalmente con el parásito.
4. Con la utilización del sistema "in vitro" desarrollado durante este trabajo, de incubaciones de secciones de piel de ratón con el parásito, concluimos que los promastigotes de Leishmania degradan glicosaminoglicanos y proteoglicanos en aproximadamente un 50%, cuando interactúan por 3 a 6 hrs., y de hasta cerca de un 80% cuando la interacción es de 24 hrs.
5. El empleo de matrices de colágena I incubadas con promastigotes de Leishmania, nos permiten sugerir que los parásitos degradan o digieren colágena tipo I, en presencia de suero, y que la cantidad degradada es de

aproximadamente 1 μ g.

6. No se observó, utilizando anticuerpos policlonales, que existiera una integración de los antígenos del parásito a la membrana del macrófago así como tampoco, que después de 24 hrs. de infección el macrófago expusiera sobre su membrana antígenos solubles del amastigote.
7. El estudio de la superficie celular del parásito, por aglutinación con lectinas y determinación de carga neta (m.e.), proporcionan una herramienta útil para detectar diferencias en las propiedades de los grupos iónicos que forman parte de la membrana celular del parásito, y que están directamente relacionados con procesos intrínsecos del mismo.
8. La incubación de promastigotes en un sustrato de colágena I, aumenta la carga superficial negativa, hecho que nos sugiere que las propiedades de la membrana del parásito están siendo modificadas por la presencia de este componente de matriz extracelular.
9. En forma general, este estudio abre una gran cantidad de perspectivas en el estudio de parásito con componentes de matriz extracelular, durante los momentos iniciales de la interacción huésped-parásito en condiciones naturales, que posiblemente estén directamente involucradas no sólo en procesos de degradación de los mismos durante la infección, sino también en el éxito final del parásito como ente intracelular. Y que finalmente nos conduzcan a entender los mecanismos de la enfermedad.

APENDICE A

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica.

1. Fijar las células con Glutaraldehído al 2.5% en un amortiguador de Cacodilatos 0.1M, por 1 hr.
2. Lavar la muestra 3X con un amortiguador de Cacodilatos 0.1M pH 7.2.
3. Postfijar con Tetróxido de Osmio (OsO_4) en Cacodilatos 0.1M, durante 1 hr.
4. Lavar 2X con Cacodilatos 0.1M
5. Deshidratar con alcoholes graduales durante 10 minutos por cada cambio. Alcohol 70°, 85°, 95°, y dos cambios de alcohol absoluto.
6. Pasar a Óxido de propileno durante 20 minutos.
7. Preincluir con una mezcla de óxido de propileno/epón durante 24 hrs.
8. Incluir con epón 812 . Polimerizar a 60°C durante 24 hrs.
9. Hacer los cortes semifinos (1 μ m) o finos (150 nm), en un ultramicrotomo.
10. Los cortes semifinos se tiñen con azul de toluidina, y los finos se contrastan con acetato de uranilo por 20 minutos y después con citrato de plomo durante 10 minutos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Adler S, 1963. Differentiation of Leishmania braziliensis from L. mexicana and L. tropica. Rev Inst Salubr Enferm trop(Mex) XXIII: 141-151.
2. Aikawa M, Hendricks L D, Ito Y, Jagusiak K M, 1982. Interactions between macrophages like cells and Leishmania braziliensis in vitro. Am J Pathol 108: 50-59.
3. Akiyama A J, Haight RD , 1971. Interaction of Leishmania donovani and hamster peritoneal macrophages. Am J trop Med Hyg 20: 539-545.
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D, 1983. Cell-cell adhesion and the extracellular matrix. Molecular Biology of cell, Garland Publusing, Inc. N.Y. : 692-715.
5. Alexander J, 1975. Effect of the antiphagocytic agent cytochalasin B on macrophage invasion by Leishmania mexicana promastigotes and Trypanosoma cruzi epimastigotes. J Protozool 22: 237-240.
6. Alexander J, 1981. Leishmania mexicana: inhibition and stimulation of phagosome-lysosome fusion in infected macrophages. Exp Parasitol 52: 261-270.
7. Alexander J, Vickerman K, 1975. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorus vacuoles of Leishmania mexicana. J Protozool 22:502-508.
8. Ayesta C, Argüello C, Hernández A G, 1985. Leishmania braziliensis: cell surface differences in promastigotes of pathogenic and non pathogenic strain. Exp Parasitol 59:185-191.
9. Andrade Z A, Reed S G, Roters S B, Sadigursky M, 1984. Immunopathology of experimental cutaneous Leishmaniasis. AJP 114: 137-148.
10. Avila J L, Rojas M, Rieber M, 1984. Antibodies to laminin in American cutaneous Leishmaniasis. Infect Immun 43: 402-406.
11. Benchimol M, De Souza W, 1981. Leishmania mexicana amazonensis: attachment to the macrophage in vivo. Z Parasitenkd 66: 25-29.
12. Blackwell J M, Alexander J, 1983. The macrophage and parasitic protozoa. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 77: 636-645.
13. Bordier C, 1987. The promastigote surface proteasa of Leishmania. Parasitology Today 3: 151-153.
14. Bornstein M B, 1958. Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in maximow slides and roller tubes. Lab Inv 7: 134-137.

15. Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
16. Bray R S, 1983. Leishmania mexicana mexicana: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages "in vitro". *J Protozool* 30: 314-322.
17. Bretaña A, Avila J L, Arias-Flores M, Contreras M, Tapia F J, 1986. Trypanosoma cruzi and American Leishmania spp: Immunocytochemical localization of a laminin-like protein in the plasma membrane. *Exp Parasitol* 61: 168-175.
18. Brown H, Neva F, 1983. *Basic clinical parasitology*. Apleton-Century-Crotts, Sa.Ed. Connecticut. : 339p.
19. Calderón J, Avila E M, 1986. *Inmunobiología*. López-Revilla, Tsutsumi, Frixione eds. *Temas Selectos de Biología celular*, Méx: SEP/COSNET/CINVESTAV. : 253-288.
20. Carvalho E M, 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal Leishmaniasis. *J Immunol* 135: 4144-4148.
21. Coombs G H, 1982. Proteinases of Leishmania mexicana and other flagellated protozoa. *Parasitol* 84: 149-155.
22. Chance M L, 1985. The biochemical and immunological taxonomy of Leishmania. Chang K P, Bray R S. *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers, B.V., N.Y.: 94-110.
23. Chang K P, 1979. Leishmania donovani promastigote-macrophage surface. Interaction in vitro. *Exp Parasitol* 48: 175-189.
24. Chang K P, 1983. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in Leishmaniasis. *Int Rev Cyt* 14(Suppl): 267-305.
25. Chang K P, Chiao J W, 1981. Leishmania donovani-macrophage binding mediated by a surface glycoproteins/antigens: Characterization in vitro by radioisotopic assay. *Mol Biochem Parasitol* 4:67-76.
26. Chang K P, Dunne F, Bray R S, 1985. Biology of Leishmania and Leishmaniasis. Chang K P, Bray R S Eds. *Leishmaniasis*. Elsevier Publishers, N.Y., 1-30.
27. Chang K P, Dwyer D M, 1978. Leishmania donovani hamster macrophage interaction in vitro: cell entry, intracellular survival and multiplication. *J Exp Med* 147: 515-530.
28. Chang K P, Fong D, 1982. Antigenic changes during intracellular differentiation of Leishmania mexicana in cultured macrophages. *Infect Immun* 36: 430-431.

29. Chanon J, Blackwell J M, 1986. Molecular biology of Leishmania. Parasitology Today 2: 45-53.
30. Chaudhuri G, Chang K P, 1988. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes. Mol Biochem Parasitol 27: 43-52.
31. Damjanov I, 1987. Biology of Disease. Lectin Cytochemistry and Histochemistry. Lab Inv 57: 5-20.
32. Dawidowicz J, Hernández A G, Infante R B, Convit J. The surface membrane of Leishmania. I. The effects of lectins on different stages of Leishmania braziliensis.
33. De Souza W, Argüello C, Martínez-Palomo A, Trissl D, González Robles A, Chiari E, 1977. Surface charge of Trypanosoma cruzi: binding of cationized ferritin and measurement of cellular electrophoretic mobility. J Protozool 24: 411-415.
34. Dulaney J T, 1979. Binding interactions of glycoproteins with lectins. Mol Cell Biochem 21: 43-63.
35. Dwyer D M, 1974. Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. Science 184: 471-473.
36. Dwyer D M, Gottlieb M, 1985. The biochemistry of Leishmania surface membranes. Chang K P, Bray R S. Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, N.Y. 31-47.
37. El-On J, Bradley D J, Freeman J C, 1980. Leishmania donovani: Action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. Exp Parasitol 49: 167-174.
38. Ehrman R L, Gray G D, 1956. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat tail collagen. J Natl Cancer Inst 16: 1375-1390.
39. Edges R J, Bouvier J, Hoffman R, Bordier C, 1985. Evidence that the major surface proteins of three Leishmania species are structurally related. Molec Biochem Parasitol 14: 141-149.
40. Fara F S, Samra S A, Nuwayri L, 1975. The role of the macrophages in the cutaneous leishmaniasis. Immunol 29: 755-764.
41. Fong D, Chang K P, 1981. Tubulin biosynthesis in the developmental cycle of a parasitic protozoan L. mexicana changes during differentiation of motile and non motile stages. Proc Natl Acad Sci USA 78:7624-7628.
42. Handman E, Goding JW, 1985. The Leishmania receptor for macrophages is a lipid containing glycoconjugate. EMBO J 4:329-336.

44. Handman E, Curtis J M, 1982. Leishmania tropica: surface antigens of intracellular and flagellate forms. *Exp Parasitol* 54: 243-249.
45. Hale C W, 1946. Histochemical demonstration of acid mucopolysaccharides in animal tissues. *Nature (London)* 157: 802-808.
46. Hart D T, Vickerman K, Coombs G H, 1981. Transformation "in vitro" of Leishmania mexicana amastigotes to promastigotes: nutritional requirements and the effects of drugs. *Parasitol* 83:529-541.
47. Hay E D, 1981. Cell biology of Extracellular Matrix. *J Cell Biol* 91: 204s-223s.
48. Hernández A G. Lectins as tool in parasite research. Department of Cell Biology: Faculty of Science. Universidad Central de Venezuela.
49. Hernández A G. Leishmanial excreted factors and their possible biological role. *Cytopathology of parasitic disease: Pitman Books London (Ciba Foundation Symposium 99)* 138-156.
50. Hernández A G, Argüello C, Ayesta C, Dagger F, Infante R B, Stojanovitch P, Dawidowicz K, Riggione F, La Riva G, 1981. The surface membrane of Leishmania. Slutzky G M Eds. *The biochemistry of parasites*. Pergamon Press, Oxford: 48-55.
51. Jacobson R L, Slutzky G M, Greenblatt C L, Schnur L F, 1982. Surface reaction of Leishmania. I Lectin-mediated agglutination. *Ann Trop Med Parasitol* 75: 45-52.
52. Jaffe Ch L, Grimaldi G, Mc Mahon-Pratt D, 1983. The cultivation and cloning of Leishmania. Morel C M Ed. *Genes and antigens of parasites*, 43-91.
53. Johnson W B, 1980. A quantitative collagen film collagenase assay for large numbers of samples. *Anal Biochem* 104: 175-181.
54. Junqueira L C U, Bignolas G, Brentani R R, 1979. A simple method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem* 94:96-99.
55. Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Säämänen A M, Herminen H J, 1985. Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry* 82: 249-255.
56. Kreutzer R D, Souraty N, Senko M E, 1987. Biochemical identities and differences among Leishmania species and subspecies. *Am J Trop Med Hyg* 36: 22-32.
57. Laison R, Shaw J J, 1978. Epidemiology and ecology of Leishmaniasis in Latin-American. *Parasitology Supp Nature* 273:595-600.
58. Levine N D, Corliss J O, Cox F E, Deroux G, Grain J, Honigberg B M,

- Leedale G F, Loeblich A R, Lon J, Lynn D, Merinfeld E G, Page E C, Poljansky G, Sprage V, Vavra J, y Wallace F G, 1980. A newly revised Classification of the Protozoa. *J Protozool* 27: 37-58.
59. Lewis D H, Peters W, 1977. The resistance of intracellular Leishmania parasites to digestion by lysosomal enzyme. *Ann Trop Med Parasitol* 6: 45-52.
 60. Manson-Bahr P E C, Winslow D J. Cutaneous Leishmaniasis. Marcial-Rojas R A Ed. Pathology of Protozoal and Helminthic diseases. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1971: 97-114.
 61. Mardsen P D, Jones T C. Clinical manifestation, diagnosis and treatment of leishmaniasis. Chang, KP, Bray RS, Eds. Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers BV, N Y 1985: 94-110.
 62. Martin G R, Timpl R, Müller P K, Kühn K, 1985. The genetically distinct collagens. *TIBS* 10: 285-287.
 63. Mc Mahon Pratt D, David J R, 1982. Monoclonal antibodies recognizing determinants specific for the promastigote stage of Leishmania mexicana. *Mol Biochem Parasitol* 6: 317-327.
 64. Mosser D M, Edelson J, 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi(CRB) is a major mechanisms in the phagocytosis of Leishmania promastigotes. *J Immunol* 135: 2785-2789.
 65. Muñoz ML, Rojkind M, 1982. The collagenase of Entamoeba histolytica. *J Exp Med* 155: 42-51.
 66. Pearson R D, Wheeler D A, Harrison L H, Kay H D, 1983. The immunobiology of Leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 5: 907-927.
 67. Pérez H, Arredondo B, González M, 1978. Comparative study of American cutaneous Leishmaniasis in two strains of inbred mice. *Infect Immun* 22:301-307.
 68. Pérez H, Labrador F, Torrealba J W, 1979. Variations in the response of five strains of mice to Leishmania mexicana. *Int J Parasitol* 9: 27-32.
 69. Pimenta P F, De Souza W, 1983. Leishmania mexicanaamazonensis: surface charge of amastigote and promastigote forms. *Exp Parasitol* 56: 194-206.
 70. Ridley D S, 1979. The pathogenesis of cutaneous Leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 73: 150-159.
 71. Ridley D S. A histological classification of cutaneous Leishmaniasis and its geographical expression. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 74,: 515-521, 1980.
 72. Ridley D S, Ridley M J, 1983. The evolution of the lesion in cutaneous

- Leishmaniasis. J Pathol 141: 83-96.
73. Ridley M J, Wells C W., 1986. Macrophage-parasite interaction in the lesions of cutaneous leishmaniasis. AJP 123: 79-85.
 74. Rosales-Encina J L, Rojkind M. The collagenase of Entamoeba histolytica. Molecular Strategies of Parasitic invasion 1987: 559-566.
 75. Russell D G, 1987. The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on Leishmania mexicana promastigotes. Eur J Biochem 164: 213-221.
 76. Schor S L, Court J, 1971. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. J Cell Sci 38: 267-281.
 77. Scott P A, Farrel J P, 1982. Experimental cutaneous Leishmaniasis in genetically susceptible and resistant mice. Am J Trop Med Hyg 31: 230-238.
 78. Servín M, Argüello C. La matriz extracelular en los procesos celulares del desarrollo. López-Revilla, Tsutsumi, Frixione Eds. Temas selectos de Biología Celular, Méx: SEP/COSNET/CINVESTAV, 1986: 109-125.
 79. Trissl D, Martínez-Palomo A, Argüello C, De la Torre M, De la Hoz R, 1977. Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains. J Exp Med 145: 652-665.
 80. Werb Z, Burleigh C, Barrett A J, Starkey P M, 1974. The interaction of α_2 -Macroglobulin with proteinasas. Biochem J 139: 359-368.
 81. Werb Z, Gordon S, 1975. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. J Exp Med 142: 346-360.
 82. Wyler D J, Sypek J P, McDonald J A. "In vitro" parasite-monocyte interactions in human Leishmaniasis. Possible role of fibronectin in parasite attachment. Infect Immun 49: 305-311, 1985.
 83. Yamada K M. Cell surface interactions with extracellular materials. Ann Rev Biochem 52:761-799, 1983.
 84. Zenian A, Rowles P, Gingell D. Scanning electron-microscopic study of the uptake of Leishmania parasites by macrophages. J Cell Sci 39: 187-199, 1979.
 85. Zuckerman A. Current status of the immunology of blood and tissue Protozoa. I. Leishmania. Parasitological Review. Exp Parasitol 4:67-76, 1975.
 86. Zuckerman A, Laison R. Leishmania. Kreier J Ed. Parasitic Protozoa. Academic Press, NY 1977: 57-133.