

1784
2º ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SEGUIMIENTO DE ALGUNOS ANTIGENOS DEL
PROMASTIGOTE DE *Leishmania mexicana*
DURANTE SU INTERNALIZACION EN EL
MACROFAGO.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a :

LETICIA REYES ANGELES

México D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN .

Las leishmaniasis son un problema de salud pública y sus agentes etiológicos son los miembros del género *Leishmania*. Un aspecto fundamental en el ciclo biológico de las leishmanias es su capacidad para establecer parasitismo intracelular en los macrófagos de los huéspedes vertebrados. De los eventos más sorprendentes para el establecimiento de este parasitismo intracelular, es su capacidad de resistir los procesos de degradación y su diferenciación de promastigotes a amastigotes. El cómo las leishmanias resisten la actividad de las enzimas hidrolíticas de los macrófagos no ha sido aclarado, sin embargo, se ha propuesto que: 1. Las leishmanias liberan factores que inhiben a las enzimas lisosomales o al metabolismo de los macrófagos. 2. Las leishmanias poseen una cubierta protectora formada por proteínas y antígenos de superficie, resistentes a la acción de las enzimas lisosomales, que durante el proceso de diferenciación se conservan o se modifican por otros más resistentes. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es llevar a cabo el seguimiento de algunos antígenos del promastigote de *Leishmania mexicana*, durante su internalización en el macrófago, con la finalidad de obtener moléculas candidato resistentes a la degradación de enzimas hidrolíticas. Para ello fue necesario producir anticuerpos

policlonales contra promastigotes de *L. mexicana*, los que se utilizaron para realizar el seguimiento de antígenos del promastigote durante la interacción e internalización *Leishmania*-macrófago, *in vitro*. Pudimos observar que el suero reconoció únicamente moléculas de la superficie celular y flagelo del parásito y no cruzo con proteínas del macrófago, además estas moléculas persistieron hasta 48 horas la actividad de degradación de los macrófagos. El suero policlonal reconoció 35 proteínas del patrón total de promastigotes, por lo que sería de interés estudiar tales proteínas como posibles candidatos de resistencia a la hidrólisis.

INDICE GENERAL.

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.	i
RESUMEN.	iv
INDICE GENERAL.	vi
INDICE DE LAMINAS, FIGURAS Y TABLAS.	ix
I. INTRODUCCION.	1
1.Generalidades de <i>Leishmania</i> .	1
2.Ciclo biológico.	7
3.Tipos de leishmaniasis.	8
3.1 Leishmaniasis visceral.	8
3.2 Leishmaniasis cutánea.	10
3.3 Leishmaniasis mucocutánea.	10
II. ANTECEDENTES.	12
1. Reconocimiento e interacción entre macrófago y parásito.	12
2. Endocitosis del parásito por el macrófago.	14
3. Sobrevivencia y diferenciación intracelular del parásito.	15
3.1 Sobrevivencia.	15
3.1.A: Cubierta protectora.	15
3.1.B: Factores inhibitorios.	16
a) Inhibidores lisosomales.	17
b) Inhibidores metabólicos.	17
3.2 Diferenciación.	18
4. Proliferación intracelular del parásito.	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	21
IV. MATERIAL Y METODO.	23
1. Cultivo de promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	23

2. Obtención de amastigotes de las extremidades posteriores de animales infectados.	24
3. Interacción entre macrófagos peritoneales de ratón Balb/c y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	26
3.1 Obtención de macrófagos peritoneales de ratón Balb/c.	26
3.2 Interacción macrófagos-promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	27
4. Producción de anticuerpos policlonales anti- <i>Leishmania</i> en conejos de la raza Nueva Zelanda.	27
4.1 Obtención de suero preimmune de conejo.	28
4.2 Producción de anticuerpos policlonales anti- <i>Leishmania</i> .	28
4.3 Titulación del suero policlonal anti- <i>Leishmania</i> por la técnica de ELISA.	30
5. Reconocimiento de antígenos de promastigotes de <i>L. mexicana</i> con suero policlonal producido en conejo.	31
5.1 Reconocimiento de antígenos de promastigotes de <i>L. mexicana</i> , durante su interacción con macrófagos peritoneales de ratón Balb/c.	32
6. Obtención de proteínas totales de promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	33
6.1 Cuantificación de proteínas.	34
6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	36
6.3 Tinción de geles de poliacrilamida.	37
7. Reconocimiento de proteínas del patrón total de promastigotes (transferidas a papel de nitrocelulosa), con suero policlonal anti- <i>Leishmania</i> .	38

7.1 Electrotransferencia de proteínas totales de promastigote a papel de nitrocelulosa.	38
7.2 Inmunodetección de proteínas del patrón total de promastigotes con suero policlonal anti- <i>Leishmania</i> .	40
V. RESULTADOS.	41
1. Producción de anticuerpos policlones contra promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .	41
2. Localización de los antígenos reconocidos por el suero policlonal anti- <i>Leishmania</i> en promastigotes de <i>L. mexicana</i> crecidos en cultivos <i>in vitro</i> .	43
3. Seguimiento de los antígenos reconocidos en promastigotes por el suero anti- <i>Leishmania</i> , durante su internalización a macrófagos, en cultivos <i>in vitro</i> .	46
4. Obtención del patrón total de proteínas de promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	49
5. Determinación del peso molecular de los antígenos reconocidos por el suero policlonal, del patrón total de proteínas de promastigotes.	50
VI. DISCUSION.	55
VII. CONCLUSIONES.	62
VIII. BIBLIOGRAFIA.	63

**INDICE DE LAMINAS, FIGURAS Y
TABLAS.**

	Pág.
Lámina 1. Fotomicrografía de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania</i> .	4
Lámina 2. Esquema de las estructuras subcelulares de <i>Leishmania</i> .	6
Lámina 3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .	9
Figura 1. Inmunofluorescencia indirecta de los antígenos reconocidos en promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	45
Figura 2. Inmunofluorescencia indirecta de los antígenos reconocidos en promastigotes de <i>L. mexicana</i> , durante su internalización a macrófagos.	48
Figura 3. Proteínas reconocidas por el suero policlonal anti- <i>Leishmania</i> , del patrón total de promastigotes	52
Tabla 1. Prueba de "positividad" del suero policlonal anti- <i>Leishmania</i> .	42
Tabla 2. Pesos moleculares de las proteínas del patrón total de promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	53-54

I . INTRODUCCION .

1. GENERALIDADES DE LEISHMANIA.

La gran mayoría de las especies de protozoarios de la Familia Trypanosomatidae son organismos patógenos de importancia médica y veterinaria en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chang, 1983 y Marr, 1984). Estos protozoarios son flagelados que se albergan en la sangre y otros tejidos de los huéspedes, por lo que son generalmente llamados hemoflagelados (Hutt y col., 1973). Dentro de esta Familia se reconocen tradicionalmente dos géneros: *Leishmania* y *Trypanosoma*. Ambos géneros tienen especies patógenas para el hombre y para otros mamíferos. Entre las enfermedades que provocan podemos mencionar la enfermedad del sueño, la enfermedad de Chagas y las leishmaniasis (Chang, 1983; Hutt y col., 1973 ; Brown y Neva, 1983), siendo estas últimas las de nuestro interés.

Los miembros del género *Leishmania* son los agentes responsables de las leishmaniasis humanas, que son enfermedades transmitidas por los moscos jejenes hembra (*Phlebotomus* spp., renombrado en América como *Lutzomya*). Las leishmaniasis son un problema de salud pública en todos los continentes excepto en Australia (Zuckerman y Lainson,

1977). Actualmente se desconoce la incidencia anual exacta de las leishmaniasis en el mundo, sin embargo, las cifras estimadas varían de 400,000 (Chance, 1981) a 12 millones de casos (Walsh y Warren en Chang y col., 1985).

La distribución geográfica de las leishmanias codistribuye con aquella de los insectos hematófagos responsables de la transmisión de la enfermedad, entre los huéspedes reservorios y el hombre (Zuckerman y Lainson, 1977; Olsen, 1974; Sleight, 1979).

Los organismos del género *Leishmania* pertenecen al Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora, Clase Zoomastigophorea, Orden Kinetoplastida, Suborden Trypanosomatina y Familia Trypanosomatidae (Levine y col., 1980).

Las leishmanias son protozoarios dimórficos, es decir, presentan en su ciclo biológico dos formas distintas, el promastigote y el amastigote. El promastigote puede crecer y multiplicarse en el tracto digestivo del huésped transmisor y en medio de cultivo *in vitro* a una temperatura de 25-28°C. Los promastigotes son células móviles con forma de huso cuya longitud promedio es de 15-20 μm y un ancho de 1.5-3.5 μm . Poseen un flagelo único anterior cerca del cinetoplasto, cuya longitud aproximada es de 15-28 μm (Chang, 1983; Olsen, 1974; Manson-Bahr y Apted, 1982; Person y col., 1983). Lámina 1A.

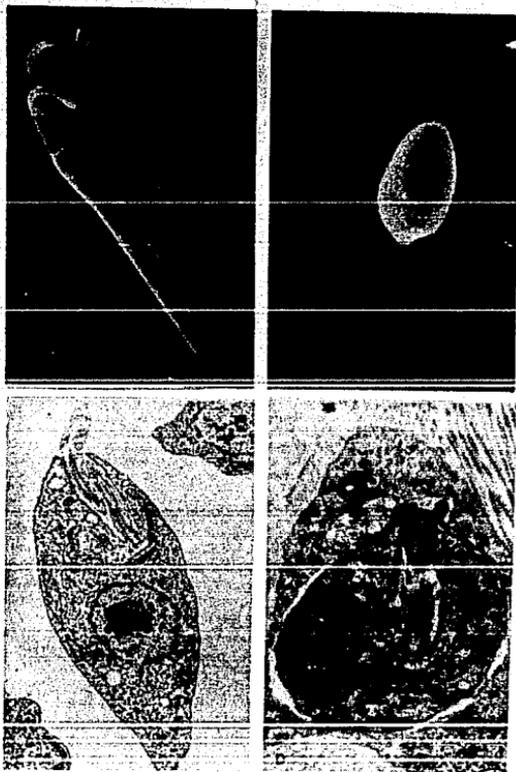
El amastigote crece y se multiplica en el huésped,

principalmente dentro de los macrófagos (Olsen, 1974). Los amastigotes son células pequeñas, redondas u ovaladas de 2-4 μ m de diámetro. Poseen un flagelo no funcional, el cual está confinado en el reservorio flagelar de la célula (Chang, 1983). Lámina 1B.

En base a estudios ultraestructurales de *Leishmania* se ha observado que poseen una variedad de organelos celulares, muchos de los cuales están presentes tanto en promastigotes como amastigotes. En el citoplasma se encuentra el núcleo relativamente grande y excéntrico en cuyo interior se localiza el nucléolo. El cinetoplasto con forma de varilla, es una sección de la mitocondria y está rodeado por una doble membrana. Dentro de este organelo hay DNA superenrollado que forma una red de microcírculos y maxicírculos concatenados. El cinetoplasto se localiza justo por debajo del cuerpo basal del flagelo de los promastigotes o del cuerpo basal del flagelo no funcional de amastigotes (Chang y col., 1985; Olsen, 1974; Wyler y Marsden, 1984). También en el citoplasma se encuentran embebidos el aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso. Tanto promastigotes como amastigotes poseen cuerpo basal, lámina basal y axonema (el que emerge cerca del cinetoplasto y se extiende hacia el extremo anterior). El axonema se encuentra más desarrollado en promastigotes (Chang y col., 1985; Manson-Bahr y Apted, 1982).

LAMINA 1.

FOTOMICROGRAFIA DE PROMASTIGOTES (A y C) Y
AMASTIGOTES (B y D) DEL GENERO *Leishmania*.
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (A y B) Y
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (C y D).
TOMADA DE CHANG Y COL., 1985.



LAMINA 1.

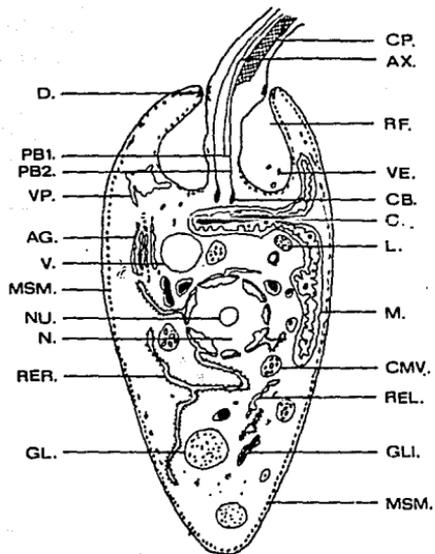
Por estudios de microscopía electrónica de transmisión, se ha observado que las leishmanias están rodeadas por una membrana plasmática, debajo de la cual se localiza una hilera de 130-200 microtúbulos que componen un sistema microtubular submembranal que da forma y flexibilidad al parásito. El flagelo (que surge del cuerpo basal) está constituido por 9 pares de microtúbulos periféricos y 2 pares centrales (Olsen, 1974; Manson-Bahr y Apted, 1982; Wyler y Marsden, 1984). La mitocondria (que es sólo una) se ramifica en muchas secciones formando una estructura alargada que se localiza justo por debajo del sistema microtubular submembranal-membrana plasmática. (Zuckerman y Lainson, 1977; Olsen, 1974; Wyler y Marsden, 1984). Lámina 2.

No se ha encontrado una fase sexual en los organismos del género *Leishmania*, por tal motivo no pueden hacerse distinciones entre machos y hembras (Chang y col., 1985).

Tanto promastigotes como amastigotes se reproducen por fisión binaria longitudinal que se inicia en el cinetoplasto que se elonga y divide; en seguida el núcleo se elonga y divide mitóticamente. Después de que el cinetoplasto se ha dividido surge un nuevo axonema del cuerpo basal hijo. Finalmente el citoplasma se divide dando como resultado la formación de dos células (Chang y col., 1985; Manson-Bahr y Apted, 1982).

LAMINA 2 -

ESQUEMA DE LAS ESTRUCTURAS SUBCELULARES DE *Leishmania*. TOMADO DE CHANG Y COL. 1985. AG= APARATO DE GOLGI; AX= AXONEMA; C= CINETOPLASTO; CB= CUERPO BASAL; CMV= CUERPOS MULTIVESICULARES; CP= CUERPO PARAXIAL O PARAFLAGELAR; D= DESMOSOMAS; GL= GOTAS LIPIDICAS; GLI= GLICOSOMAS; L= LISOSOMAS; M= MITOCONDRIA; MSM= MICROTUBULOS SUBMEMBRANALES; N= NUCLEO; NU= NUCLEOLO; PB1= PLACA BASAL 1; PB2= PLACA BASAL 2; RF= RESERVORIO FLAGELAR; REL= RETICULO ENDOPLASMICO LISO; RER= RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO; V= VACUOLAS; VE= VESICULAS. VP= VESICULAS PULSATILES.



LAMINA 2.

2. CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo biológico de *Leishmania* involucra una existencia alternada dentro de un vertebrado y un insecto. Los huéspedes vertebrados además del hombre son perros domésticos, roedores (de los bosques o desiertos), perezosos, zorros y otros. Los huéspedes transmisores son los moscos jejenes hembras que pertenecen a la Clase Insecta, Orden Diptera, Familia Psychodidae, Subfamilia Phlebotominae, Género *Lutzomya*.

Cuando el jejen hembra se alimenta con sangre de un huésped infectado, los amastigotes que se encuentran dentro y fuera de los macrófagos son ingeridos (junto con la sangre), pasan al intestino medio en donde se transforman en promastigotes y proliferan por fisión binaria longitudinal. Posteriormente, los promastigotes migran hacia la porción anterior del intestino en cuyo epitelio se adhieren con ayuda de su flagelo. Esta porción del intestino puede ser obstruída por una gran cantidad de flagelados, los cuales se mueven hacia la región anterior del tracto digestivo y contaminan la región faríngea y la cavidad bucal, de tal manera que cuando el insecto se alimenta nuevamente, su saliva junto con los parásitos son inyectados en la piel del vertebrado. En la región de la dermis los promastigotes son reconocidos como cuerpos extraños y son endocitados por los

macrófagos, dentro de los cuales se diferencian a amastigotes y comienzan un proceso de multiplicación. Cuando un macrófago está altamente parasitado se lisa, los amastigotes se liberan y posteriormente son endocitados por otros macrófagos. Cuando otro mosquito hembra no infectado se alimenta de la sangre del huésped vertebrado con leishmaniasis se infectará y se repetirá el ciclo biológico del parásito (Hutt y col., 1973; Brown y Neva, 1983; Olsen, 1974; Manson-Bahr y Apted, 1982). Lámina 3.

3. TIPOS DE LEISHMANIASIS.

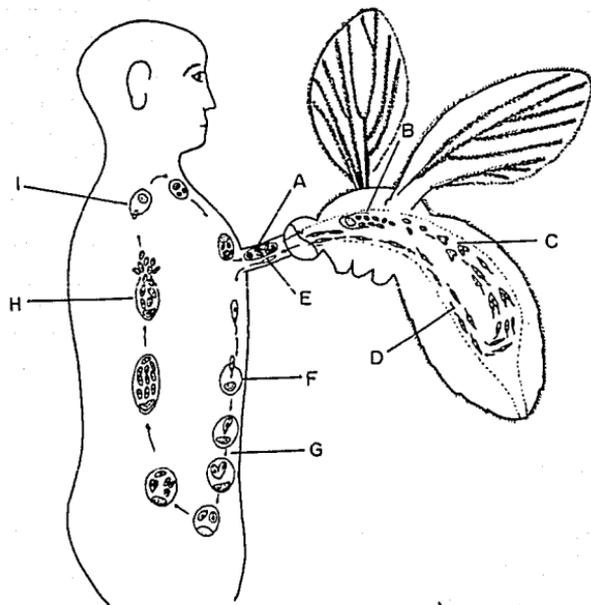
Leishmaniasis es el nombre común que se da a las enfermedades crónicas causadas por algún miembro del género *Leishmania*. Al menos cuatro especies de *Leishmania* son las que infectan al hombre: *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* (Brown y Neva, 1983).

3.1. Leishmaniasis visceral.

Leishmania donovani es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral, también conocida como Kala-azar. En la leishmaniasis visceral los parásitos que son fagocitados

LAMINA 3 .

CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania*. A: CUANDO UN MOSCO JEJEN HEMBRA SE ALIMENTE CON SANGRE DE UN HUESPED INFECTADO, LOS MACROFAGOS SERAN INGERIDOS JUNTO CON LA SANGRE. B: LOS MACROFAGOS SERAN DIGERIDOS Y LOS AMASTIGOTES LIBERADOS. C: EN EL INTESTINO MEDIO DEL MOSCO, LOS AMASTIGOTES SE DIFERENCIARÁN A PROMASTIGOTES Y SE REPRODUCIRAN POR FISION BINARIA. D: LOS PROMASTIGOTES MIGRARAN HACIA EL INTESTINO ANTERIOR. E: CUANDO EL MOSCO SE ALIMENTE DE OTRO HUESPED, LOS PROMASTIGOTES JUNTO CON LA SALIVA SERAN INYECTADOS EN LA PIEL DEL HUESPED. F: EN LA DERMIS, LOS PROMASTIGOTES SERAN ENDOCITADOS POR LOS MACROFAGOS. G: LOS PROMASTIGOTES SE DIFERENCIARAN A AMASTIGOTES Y SE REPRODUCIRAN POR FISION BINARIA. H: CUANDO LOS MACROFAGOS ESTEN ALTAMENTE PARASITADOS, SE LISARAN Y SE LIBERARAN LOS AMASTIGOTES. I: LOS AMASTIGOTES SERAN ENDOCITADOS POR OTROS MACROFAGOS. CUANDO OTRO MOSCO SE ALIMENTE DE ESTE HUESPED INFECTADO, SE REPETIRA EL CICLO.



LAMINA 3.

se encuentran en mayor número dentro de los macrófagos del bazo, hígado, nódulos linfáticos y mucosa intestinal. Los individuos que adquieren esta enfermedad y que no reciben tratamiento, generalmente mueren debido a la producción de anemia severa o hemorragias gastrointestinales (Wylar y Marsden, 1984).

3.2. Leishmaniasis cutánea.

La leishmaniasis cutánea también conocida como úlcera oriental es provocada por *Leishmania tropica*. Como su nombre lo dice, la infección está limitada al tejido cutáneo y ocasionalmente, en el caso de la cara, a las membranas mucosas. Esta enfermedad se caracteriza por formar lesiones ulceradas, que se pueden infectar secundariamente con bacterias. Las lesiones que no se infectan pueden sanar en un período de 2 a 10 meses dejando cicatrices no pigmentadas o desfiguración de la cara (Brown y Neva, 1983).

3.3 Leishmaniasis muco-cutánea.

La leishmaniasis muco-cutánea, también conocida como leishmaniasis americana, espundia, uta o úlcera del chiclero, es producida por *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis*.

Leishmania mexicana está principalmente distribuida

en el sureste de México, Belice y Guatemala. La infección está confinada a la piel de la cara, brazos y piernas o puede ocurrir metástasis de la infección a las membranas mucosas. Durante el desarrollo de la infección se forman lesiones ulceradas que pueden llegar a provocar mutilación en el paciente (Wyler y Marsden, 1984).

La enfermedad causada por *Leishmania braziliensis* comienza con lesiones en la piel. La infección puede tener metástasis a la mucosa oronasofaríngea, probablemente por medio del torrente sanguíneo, de tal manera que la pared cartilaginosa del septo es destruida y si la destrucción progresa se desarrollan deformaciones faciales con pérdida total de la nariz y el labio superior, incluyendo también los párpados inferiores, (Brown y Neva, 1983; Wyler y Marsden, 1984).

II. ANTECEDENTES.

Un aspecto fundamental en el ciclo biológico de los organismos del género *Leishmania* es su capacidad para establecer parasitismo intracelular obligado en los macrófagos de los huéspedes vertebrados. Chang (1983) reconoce cuatro eventos secuenciales para el establecimiento de este parasitismo intracelular y son:

- 1.- Reconocimiento e interacción entre macrófago y parásito.
- 2.- Endocitosis del parásito por el macrófago.
- 3.- Sobrevivencia y diferenciación intracelular del parásito.
- 4.- Proliferación intracelular del parásito.

1.- RECONOCIMIENTO E INTERACCION ENTRE MACROFAGO Y PARASITO.

Se han propuesto, al menos, tres mecanismos distintos de reconocimiento e interacción *Leishmania*-macrófago y son:

- a) Vía moléculas opsonizantes y receptores C3b.
- b) Vía fibronectina.
- c) Vía glicoconjugados y receptores tipo lectinas.

Blackwell y col. (1981), Bray (1983), Mosser y

Edelson (1984) propusieron que el reconocimiento e interacción de las leishmanias con los macrófagos se realiza mediante los receptores C3b de macrófagos (estos receptores son específicos para uno de los dos productos de la ruptura de la molécula C3 de la cascada del complemento). Estos investigadores observaron que los promastigotes pueden fijar moléculas opsonizantes sobre su superficie (por ejemplo anticuerpos y moléculas del complemento), facilitando de esta manera su unión a los receptores C3b de los macrófagos.

Wyler y col. (1985) sugirieron la posible participación de la fibronectina (glicoproteína de 220 kDa) en la adherencia de promastigotes a monocitos humanos.

Por otro lado, estudios realizados por Chang (1981, 1983), Zenian (1981) y Bray (1983) sugirieron que la unión macrófago-*Leishmania* es una interacción mediada por glicoconjugados de la superficie del parásito (glicoproteínas o glicolípidos con residuos terminales de manosa, fucosa, galactosa, glucosa, N-acetil-glucosamina o ácido siálico) y receptores del tipo de lectinas en la superficie de los macrófagos. Así por ejemplo, Chang y Chang (1986), Handman y Goding (1985), Russell y Wilhelm (1986), sugirieron que el antígeno de la superficie membranal de promastigotes (glicoproteína de 63 kDa), juega un papel importante en las interacciones leishmanias-macrófagos, debido a que observaron que la presencia de este glicoconjugado inhibe la unión de los promastigotes a los

macrófagos hasta en un 50%.

Wilson y Pearson (1986) propusieron que el receptor tipo fucosa-manosa (RFM) de macrófagos juega un papel importante en el reconocimiento e interacción de las leishmanias.

2.- ENDOCITOSIS DEL PARASITO POR EL MACROFAGO.

Se ha observado que el fenómeno de internalización de los parásitos por los macrófagos depende del buen funcionamiento metabólico de los macrófagos.

Alexander (1975) mostró la participación del citoesqueleto (microfilamentos) en la internalización de los parásitos. Este autor observó que durante la interacción de leishmanias y macrófagos en presencia de Citocalasina B los parásitos no eran endocitados. Además, observó que el efecto de la Citocalasina B era reversible, debido a que cuando puso a interaccionar macrófagos (previamente incubados en presencia de la droga), con parásitos en medio sin citocalasina B, las leishmanias eran fagocitadas.

Por otra parte, Blackwell y Alexander (1983), sugirieron que la internalización de las leishmanias se inicia con la interacción secuencial entre los receptores del macrófago y los ligandos del parásito; además de que requiere de la participación de la actina y miosina así como

de la energía generada por el fagocito.

3.- SOBREVIVENCIA Y DIFERENCIACION INTRACELULAR DEL PARASITO.

Los eventos más sorprendentes durante el establecimiento del parasitismo intracelular de las leishmanias son su sobrevivencia y diferenciación dentro de los macrófagos (Chang, 1983).

3.1. Sobrevivencia.

Actualmente no se sabe con exactitud cómo las leishmanias resisten la actividad de las enzimas hidrolíticas de los macrófagos, sin embargo, se han propuesto dos hipótesis para explicar el fenómeno de sobrevivencia y son:

3.1.A: Cubierta protectora (Chang y Dwyer, 1976). Esta hipótesis propone que las leishmanias poseen en su superficie moléculas resistentes a la acción de las enzimas lisosomales. La hipótesis ha sido apoyada por investigadores que han estudiado proteínas y antígenos de la superficie membranal del parásito. Chang, K-P. (1980) y Nogueira y col. (1981) al estudiar la interacción de promastigotes con macrófagos, observaron que moléculas de la superficie del

parásito persistieron por más de 36 horas sin que fueran degradadas. Estas moléculas fueron identificadas como glicoproteínas de superficie de 68 000 y 43 000 daltones.

Por otra parte, Handman y col. (1981, 1982), Kahl y MacMahon-Pratt (1987) observaron que proteínas de la superficie de promastigotes y amastigotes fueron resistentes a la degradación por la proteasa estafilococal V-8, papaina o quimotripsina así como al tratamiento a 37°C, siendo aún más resistentes las moléculas de amastigotes. Este hecho sugiere que dichas proteínas pueden conferir al parásito resistencia a la acción de las enzimas lisosomales.

3.1.B: Factores inhibitorios. Esta hipótesis sugiere que las leishmanias liberan factores que participan en la biología y sobrevivencia del parásito actuando como inhibidores de las enzimas lisosomales (Alexander y Vickerman, 1975; El-On y col., 1980) o bien, como inhibidores metabólicos de los macrófagos, es decir, se ha sugerido que estos factores son probablemente los responsables de cambios metabólicos de macrófagos infectados con *Leishmania* (Handman y Greenblatt, 1977; Kutish y Janovy, 1981; Rodríguez y col., 1983). Estos dos hechos se basan en los siguientes antecedentes.

a: Inhibidores lisosomales.

En 1977 Lewis y Peters observaron que la actividad de la fosfatasa ácida de macrófagos infectados con *Leishmania* era inhibida, por lo que sugirieron que algún componente liberado por los parásitos evitaba el que fueran degradados por las enzimas lisosomales, las cuales son liberadas dentro de la vacuola parasitófora (sitio en el que se albergan los parásitos). El-On y col. (1980) observaron que el factor secretado y parcialmente purificado de *Leishmania* inhibió, aproximadamente en un 72% la actividad hidrolítica de la β -galactosidasa de macrófagos.

Schnur y col. (1972), Decker-Jackson y Honigberg (1978), Slutzky y Greenblatt (1979) encontraron un compuesto dentro de macrófagos infectados, que comigra con los factores secretados por promastigotes de *Leishmania*, por lo que propusieron que los amastigotes conservan la capacidad de sintetizar los factores de secreción.

b: Inhibidores metabólicos.

Slutzky y Greenblatt (1979) observaron que la síntesis de proteínas de macrófagos era afectada cuando estas células estaban infectadas con leishmanias, por lo que sugirieron que los parásitos (al igual que otros parásitos) afectan la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula huésped. Por otra parte, Kutish y Janovy (1981) describieron que la actividad digestiva de macrófagos infectados con

Leishmania disminuyó en un 50% durante una segunda interacción con el parásito, en comparación con la actividad de macrófagos no infectados. Posteriormente, Rodríguez y col. (1983) observaron que la actividad endocítica y la capacidad digestiva de macrófagos tratados con el factor de secreción, purificado del medio de cultivo de *Leishmania*, también disminuyó hasta en un 50%. En base a estos resultados, estos investigadores sugirieron que la capacidad digestiva de los macrófagos era afectada por un proceso activo de moléculas liberadas por los amastigotes, inhibiendo funciones específicas del macrófago.

Por otra parte, Serman y Dwyer (1981) demostraron la presencia de antígenos del parásito en la membrana plasmática de macrófagos infectados y sugirieron que quizá algún (os) antígeno (s) del amastigote sea(n) procesado (s) por el fagolisosoma después liberado y readsorbido, sin embargo, aún no es claro cual es la función del antígeno en la membrana del macrófago, pero se cree podría ser un mecanismo de sobrevivencia del parásito.

3.2 Diferenciación.

Se ha sugerido que el microambiente intracelular y la temperatura corporal del huésped mamífero pueden ser de importancia en la diferenciación de promastigotes a amastigotes (Lamy y col., 1967; Frothingham y Lehtimaki,

1969; Akiyama y Taylor, 1970 en Chang, 1983). Hendricks y col. (1978) sugirieron que solamente un cambio en la temperatura puede ser suficiente para que se inicien los cambios morfológicos de algunas especies de *Leishmania*, sin embargo, es necesario realizar más investigaciones con el fin de dilucidar el control de los mecanismos para la diferenciación intracelular de leishmanias.

Fong y Chang (1981, 1982); Chang y Fong (1982) estudiaron los cambios moleculares y antigénicos que acompañan la diferenciación intracelular de *Leishmania* en sistemas *in vitro*. Estos autores observaron que uno de los cambios moleculares durante el proceso de diferenciación intracelular de *Leishmania* es la biosíntesis de tubulina, proteína de aproximadamente 55 000 daltones de peso molecular que decrece en intensidad durante la diferenciación de los parásitos, y proteínas cuyos pesos moleculares están entre 24 y 68 KDa. Además, encontraron que la diferenciación intracelular ocurre a 35°C y que se lleva a cabo aproximadamente en una semana.

Por otra parte, Handman y Höcking en 1982 observaron que el bloqueo de los antígenos de la superficie celular de promastigotes inhibió la diferenciación intracelular de los parásitos.

En 1986 Williams y col. identificaron un antígeno principal de la superficie membranal de promastigotes de *Leishmania*, que se conserva durante la diferenciación

intracelular de los parásitos. Estos autores observaron que este antígeno es resistente a la degradación lisosomal y después de 6 horas post-infección *in vitro*, se expresa en la superficie de macrófagos infectados, sin embargo, se desconoce cual es la función del antígeno en la superficie del macrófago.

4.- PROLIFERACION INTRACELULAR DEL PARASITO.

La proliferación de las leishmanias dentro de los macrófagos es el último evento en el establecimiento del parasitismo intracelular. De este evento no se sabe mucho, debido a que el cultivo continuo de amastigotes en sistemas *in vitro* no ha podido ser posible (Chang K-P., 1980; Handman y Spira, 1977) . Se sabe muy poco de las condiciones físicas y nutritivas necesarias para la proliferación de los amastigotes, excepto que requieren de la temperatura de la dermis de sus huéspedes mamíferos, 34-35°C (Chang, 1983).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En base a los antecedentes anteriores se sabe que existen, al menos, cuatro eventos secuenciales en el establecimiento del parasitismo intracelular. Hasta la fecha, con base a estudios realizados por Bray (1983), Mosser y Edelson (1984), Chang (1983), Handman y Goding. (1985), Chang y Chang (1986), El-On y col. (1980), Russell y Wilhelm (1986), entre otros, se han propuesto algunas hipótesis que tratan de explicar cómo se llevan a cabo cada uno de estos eventos, sin embargo, aún hacen falta más investigaciones que permitan tener un conocimiento amplio de cada uno de ellos.

Los eventos más sorprendentes durante el establecimiento del parasitismo son la sobrevivencia y diferenciación de las leishmanias dentro del sistema vacuolar de los macrófagos, fagosoma-lisosoma. Los mecanismos precisos mediante los cuales estos parásitos evaden los factores microbicidas del fagolisosoma no han sido aclarados, pero se ha sugerido que antígenos de la superficie celular de la leishmania y factores secretados por el parásito juegan un papel importante.

Tomando en consideración lo anteriormente descrito nos propusimos llevar a cabo el siguiente estudio:

SEGUIMIENTO DE ALGUNOS ANTIGENOS DEL PROMASTIGOTE DE
Leishmania mexicana DURANTE SU INTERNALIZACION EN EL
MACROFAGO.

Para abordar este problema nos propusimos como
objetivos particulares:

1. Localizar los antigenos reconocidos por el suero policlonal anti-*Leishmania* en promastigotes crecidos en cultivos *in vitro* y en proteínas totales de promastigotes, transferidas a papel de nitocelulosa.
2. Seguir los antigenos reconocidos por el suero policlonal anti-*Leishmania* en los promastigotes durante su internalización a macrófagos en cultivos *in vitro*.

III. MATERIAL Y METODOS.

Para cumplir con los objetivos propuestos en éste trabajo fue necesario:

Mantener, en cultivos axénicos e *in vitro*, una cepa de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Mantener la infectividad del parásito infectando animales de laboratorio.

Producir anticuerpos policlonales contra promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Obtener el patrón total de proteínas de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

1. CULTIVO DE PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*.

Los parásitos utilizados en este trabajo fueron de la especie *Leishmania mexicana*, los cuales fueron aislados de un paciente que presentó leishmaniasis cutánea difusa. Las metodologías empleada para el cultivo de los parásitos y para mantener infectivos a los parásitos fueron establecidas en el laboratorio del Dr. Carlos Argüello, del CINVESTAV., Departamento de Patología Experimental.

Los promastigotes se mantuvieron en medio mínimo esencial, MEM (Gibco Laboratories, U.S.A.), Na_2HPO_4 (6 mM),

KH_2PO_4 (1 mM), pH 7.5, penicilina (100 U/ml), estreptomocina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco Laboratories, U.S.A.).

Los promastigotes (1×10^6) fueron resembrados cada ocho días (fase estacionaria) en 10 ml de medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino en botellas de cultivo de 25 cm^2 (Falcon) y se incubaron a 25 °C.

Para mantener infectivos a los parásitos, 5×10^5 promastigotes fueron inculados en las extremidades posteriores de hamsteres dorados de dos meses de edad. Después de dos meses los hamsteres manifestaron la enfermedad (leishmaniasis) en el área donde fueron inculados los parásitos.

2. OBTENCION DE AMASTIGOTES DE LAS EXTREMIDADES POSTERIORES DE ANIMALES INFECTADOS.

La metodología empleada para la purificación de amastigotes fue la propuesta por Hart y col., 1981.

Los hamsteres dorados infectados con *L. mexicana* fueron sacrificados por sobredosis de éter. Las extremidades posteriores se limpiaron con alcohol al 70%, se amputaron y se lavaron con abundante PBS estéril (0.145M, pH7.4). Las extremidades se colocaron en una caja de Petri estéril con medio de cultivo (MEM) y se descarnaron con ayuda de

tijeras. El tejido se cortó en pedazos pequeños y posteriormente se homogenizó durante 1 min., con un homogenizador mecánico, de velocidad constante (1725 rpm). El homogenado se centrifugó a 35 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante, el que se centrifugó a 1300 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 2 ml de Tris-NH₄Cl (0.017 M, 0.144 M respectivamente) pH 7.2 y se incubó a 37 °C, durante 2 minutos. Las células se lavaron con PBS pH 7.4 a 1300 x g durante 15 minutos. Las células se resuspendieron en PBS-EDTA-Glucosa (0.145 M, 2 mM, 50 mM, respectivamente), pH 7.4 y la suspensión se pasó a través de una pipeta Pasteur con punta de diámetro reducido. Las células se centrifugaron a 1300 x g por 15 minutos y la pastilla se resuspendió en 4 ml de Percoll al 45% (Sigma). Se preparó un gradiente de Percoll discontinuo en tubos de policarbonato estériles de 15 ml (Nalgene), de la siguiente manera: primero se agregaron 1.5 ml de Percoll al 70%, en seguida 4.0 ml de Percoll al 45% con las células resuspendidas y finalmente 4.5 ml de Percoll al 25%. El gradiente se centrifugó a 4500 rpm, a 4 °C durante 60 minutos en una centrifuga Beckman Accu Spin FR. Una vez centrifugado el gradiente se recolectó la interfase entre el gradiente de 45% y 25% (donde se encontraban los amastigotes) y se lavó con 45 ml de PBS, pH 7.4. Los amastigotes se resuspendieron en 2 ml de medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10%

de suero fetal bovino y se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm² (Falcon), en 10 ml de medio y se incubaron a 25 °C. Las células se resemebraron cada tercer día durante dos ocasiones (hasta que se diferenciaron a promastigotes) y posteriormente se continuaron las resiembras cada ocho días.

3. INTERACCION ENTRE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON BALB/C Y PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*.

3.1 Obtención de macrófagos peritoneales de ratón Balb/c.

Las metodologías empleada para la obtención de macrófagos e interacción con los parásitos se establecieron en el laboratorio del Dr. C. Argüello.

Se utilizaron ratones Balb/c de dos meses de edad. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. La piel del abdomen se limpio con alcohol y se retiró para dejar al descubierto el peritoneo. En la cavidad peritoneal del ratón se inyectaron 5 ml de medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino a 35 °C. Pasados aproximadamente 3 minutos se extrajo el medio de cultivo junto con los macrófagos, se cuantificó el número de macrófagos y se sembraron 2×10^6 macrófagos en cajas de Petri estériles de 3 cm de diámetro, las cuales contenían cubreobjetos perfectamente limpios y estériles. Las cajas se incubaron durante toda la noche a 37 °C en cámaras húmedas

para que los macrófagos se adhirieran a los cubreobjetos. Los cultivos se lavaron tres veces con medio MEM estéril a 35 °C para eliminar macrófagos que no se adhirieron.

3.2. Interacción macrófagos-promastigotes de *L. mexicana*.

A cultivos de macrófagos peritoneales de ratón Balb/c se les adicionaron promastigotes (cosechados de cultivos en fase estacionaria) previamente lavados con MEM fresco, en una relación 1:5 respectivamente. Los cultivos en interacción se dejaron durante 1 hora a 28 °C y después se incubaron a 36 °C durante 2, 5, 24 y 48 horas. Los cultivos de 24 y 48 horas de interacción se lavaron con medio de cultivo fresco a 36 °C, después de haber transcurrido 6 y 24 horas de interacción y nuevamente se agregó medio fresco. Los cultivos de 2 y 5 horas de interacción se fijaron para su uso posterior.

4. PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-*Leishmania* EN CONEJOS DE LA RAZA NUEVA ZELANDA.

La metodología empleada para la obtención de suero preinmune, producción de anticuerpos policlonaes anti-*Leishmania* y obtención de suero inmune fue asesorada por el Dr. Leopoldo Santos de la Escuela de Ciencias Biológicas del

IPN., Departamento de Inmunología.

4.1. Obtención de suero preinmune de conejo.

Antes de comenzar a inocular al conejo con promastigotes de *L. mexicana*, se obtuvo suero del mismo (suero preinmune), el cual se utilizó como suero control en todos los experimentos.

Con una jeringa de 20 ml y aguja gruesa se obtuvo sangre de la vena central de la oreja del conejo. La sangre se vació a un tubo estéril (previamente frío) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos, el coágulo formado se pico en repetidas ocasiones con una varilla y se incubó por 1 hr a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. El sobrenadante (Suero preinmune) se colectó y se dosificó en tubos Eppendorf estériles. El suero se almacenó a -70 °C hasta su uso. Antes de utilizar el suero se inactivó a 56 °C durante 120 minutos.

4.2. Producción de anticuerpos policlonales anti-*Leishmania*.

Cien millones de promastigotes se cosecharon en fase estacionaria y se lavaron con PBS estéril (0.145 M) pH 7.4 mediante centrifugación a 850 g, durante 10 minutos a

temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS estéril y las células se lisaron mediante siete ciclos de congelación-descongelación. El lisado se emulsificó en 1 ml de adjuvante completo de Freund (Dibco Laboratories, U.S.A.) y se inoculó subcutáneamente en el dorso del conejo. Después de quince días de la primera inoculación, 1×10^8 parásitos lavados, resuspendidos en 1 ml de PBS estéril, lisados por congelación-descongelación y emulsificados en 1 ml de adjuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, U.S.A.) se inocularon subcutáneamente al conejo. Quince días después, por tercera ocasión se inocularon por vía subcutánea 1×10^8 promastigotes lavados, resuspendidos en PBS estéril (1 ml) y lisados mediante congelación-descongelación. Después de 15 días se realizaron 16 inoculaciones por vía intravenosa (en la oreja del conejo), con 100 millones de parásitos lavados y resuspendidos en 0.1 ml de PBS estéril y Timerosal 0.01%, dichas inoculaciones se realizaron cada tercer día. Después de 12 días de la última inoculación se obtuvo el suero inmune (de la misma manera como se obtuvo el suero preinmune) y se almacenó a -70°C . Antes de utilizar el suero inmune, se inactivó a 56°C durante 120 minutos.

4.3. Titulación del suero policlonal anti-*Leishmania* por la técnica de ELISA.

La metodología empleada para la técnica de ELISA fue la utilizada por Clamp y col., (1971), modificada en el laboratorio de la Dra. Esther Orozco del CINVESTAV, Departamento de Patología Experimental.

Noventa y seis pozos de una placa de microtitulación se recubrieron con 200 μ l de una solución de antígeno de promastigotes lisados de *L. mexicana* (20 μ g/ml de proteína) en amortiguador de carbonato de sodio 10 mM, pH 9.6 y se incubó toda la noche a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y los pozos se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.05%, durante 3 minutos cada vez. Los pozos se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween 0.05%, por 30 minutos a 37 °C. El sobrenadante se eliminó y los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.05%. En seguida se agregaron 100 μ l. de suero policlonal anti-*Leishmania* a diferentes diluciones (1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 y 1/1000, una dilución por pozo y por duplicado) y se dejaron incubando toda la noche a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.05%. Posteriormente a cada pozo se le agregaron 100 μ l de anticuerpo Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Cappel Research Reagents Product Guide, Bélgica.), diluido 1/1250 en PBS-Tween 0.05% y leche descremada al 5%, se dejó incubando a 37 °C por 90 minutos. Después de la incubación, el sobrenadante se eliminó, los pozos se lavaron con PBS-

Tween 0.05% y en seguida se añadieron a cada pozo, 200 μ l del sustrato recién preparado, ortofenildiamina 0.04% y H_2O_2 0.01% disueltos en amortiguador de fosfatos 50 mM y citrato 25 mM pH 5.0, se incubó por 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Posteriormente se agregaron 50 μ l de H_2SO_4 2.5 M por pozo para detener la reacción y se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA (Minireader II, Dynatech Laboratories, INC., version 2.0).

5. RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*, CON SUERO POLICLONAL PRODUCIDO EN CONEJO.

La metodología empleada para el reconocimiento de antígenos de promastigotes con suero policlonal se estableció en el laboratorio del Dr. C. Argüello.

Promastigotes de *L. mexicana* fueron cosechados de cultivos en fase estacionaria mediante centrifugación a 850 g por 10 minutos. Las células se lavaron con PBS frío y se fijaron durante 30 minutos con formaldehído al 1%. Los parásitos se lavaron con PBS frío, se trataron durante 30 minutos con cloruro de amonio 0.005 M en solución salina (para bloquear los grupos aldehído), se lavaron con NaCl 0.145 M pH 7.0 y finalmente con suero bovino al 1% en NaCl 0.145 M pH 7.0. Los promastigotes se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con suero de conejo anti-

Leishmania (dilución 1/100 en NaCl 0.145 M). Las células se lavaron con NaCl 0.145 M y se incubaron con Anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína (FITC, de Polysciences, INC. U.S.A.) diluido 1/50 en PBS, durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 25 µl de Glicerol al 66% en PBS. La preparación se montó y se observó al microscópio de fluorescencia (MicroStar, Vertical Fluorescence, American Optical, U.S.A.).

Nota: Los ensayos control se hicieron exactamente igual, excepto que como primer anticuerpo se utilizó suero preinmune de conejo, (diluido 1/100 en NaCl 0.145 M pH 7.0).

5.1 Reconocimiento de antígenos de promastigotes de *L. mexicana*, durante su interacción con macrófagos peritoneales de ratón Balb/c.

Los tiempos de interacción que se utilizaron fueron 2, 5, 24 y 48 horas.

Concluidos los tiempos de interacción, los cultivos se lavaron con PBS a 36°C y se incubaron con suero normal de ratón al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3% en PBS durante 20 minutos. Los cultivos se lavaron con PBS y se bloquearon con cloruro de amonio 0.005 M en PBS durante 30 minutos. Las células se

lavaron con PBS, posteriormente con suero bovino al 1% en PBS y, finalmente con PBS. En seguida se incubaron con suero de conejo anti-*Leishmania*, dilución 1/100 en PBS durante 20 minutos a 25 °C. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos en oscuridad con Anti-IgG de conejo conjugado a FITC (Polysciences, INC.) diluido 1/50 en PBS. Las células se lavaron con PBS, las preparaciones se montaron con glicerol al 66% en PBS y se observaron al microscópio de fluorescencia.

Las células que interaccionaron 5, 24 y 48 horas se fijaron con paraformaldhído al 3% en PBS y se permeabilizaron con acetona fría durante 3 minutos. Posteriormente los cultivos se bloquearon con cloruro de amonio 0.005 M durante 30 minutos y se siguió la misma metodología anteriormente mencionada.

El control negativo se hizo para cada tiempo de interacción, sólo que como primer anticuerpo se utilizó suero preimmune de conejo diluido 1/100 en PBS y se siguió la metodología anteriormente mencionada.

6. OBTENCION DE PROTEINAS TOTALES DE PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*.

Cien millones de promastigotes de cultivos en fase estacionaria fueron cosechados por centrifugación a 850 x g por 10 minutos. Las células se lavaron con PBS frío y la

pastilla se resuspendió en 10 μ l de p-hidroximercuribenzoato 100 mM (SIGMA). Las células se lisaron mediante siete ciclos de congelación-descongelación. Al extracto obtenido se le agregaron 40 μ l de amortiguador de muestra, que contenía Trizma-base 0.27 M pH 6.7, EDTA 0.2 M pH 8.0, SDS 2%, Glicerol 10% y β -mercaptoetanol 5%. La muestra se hirvió por 5 minutos, se centrifugó por 1 minuto a 16000 x g (Microcentrifuge Eppendorf, modelo 5415) a 4 °C y al sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas.

6.1 Cuantificación de proteínas.

La técnica empleada para la cuantificación de proteínas fue la descrita por Ausubel y col. (1985), que es una técnica modificada a partir de Lowry (1951).

A 2 μ l de muestra de proteínas se le agregaron 198 μ l de agua bidestilada. En seguida se adicionaron 20 μ l de desoxicolato de sodio 0.15%, se mezcló mediante el uso de vortex e incubó a 4 °C durante 5 minutos. Se adicionaron 20 μ l de ácido tricloroacético 72%, se mezcló e incubó 5 minutos a 4 °C. Se centrifugó a 16000 x g por 5 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. La pastilla (proteínas) se disolvió en 200 μ l de agua bidestilada y se adicionó 1 ml de solución C (un volumen de CuSO_4 al 0.5% y 50 volúmenes NaCO_3 al 2% en NaOH al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%). Se mezcló bien y se

dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteus, en una relación 1:1 con agua bidestilada, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente por 45 minutos. Pasado el periodo de incubación, se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro (Spectronic 1001) a la longitud de onda de 660 nm.

Para conocer la concentración de proteínas de la muestra problema, se utilizó una curva de calibración con albúmina bovina a las siguientes concentraciones, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ g de proteína. Cada una de las concentraciones de proteína se pusieron en tubos por separado y por duplicado. Cada tubo con la albúmina se completo a 200 μ l con agua bidestilada y se mezcló. En seguida se adicionaron 20 μ l de desoxicolato de sodio 0.15%, se mezcló perfectamente con vortex y se incubó 5 min a 4 °C. A cada tubo se adicionaron 20 μ l de ácido tricloroacético al 72%, se mezcló con vortex y se incubó 5 min a 4 °C. La muestra se centrifugó a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se dejó secar. La pastilla se resuspendió en 200 μ l de agua bidestilada. A cada tubo se agregó 1 ml de solución C (un volumen de CuSO_4 al 0.5% y 50 volúmenes de NaCO_3 al 2% en NaOH al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%). Se mezcló bien y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteus en una

relación 1:1 con agua bidestilada, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente por 45 minutos. Finalmente se midió a cada tubo su densidad óptica a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro Spectronic 1001. Las concentraciones de albúmina de cada tubo con sus respectivos valores de densidad óptica fueron graficados y analizados por regresión lineal. Ya obtenida la curva de calibración, la densidad óptica de la muestra problema fue interpolada en la ecuación de regresión, obteniendo de esta manera su concentración de proteínas.

6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Las proteínas totales de los promastigotes se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970).

Los geles se prepararon en moldes de 10 x 10 cm y 0.75 mm de grosor, para lo cual se vaciaron 6 ml de solución del gel separador, que contenía acrilamida 10%, N,N-metilenbis-acrilamida 0.27%, SDS 0.1%, glicerol 5%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.14%, disueltos en amortiguador de trizma 1.5 M el cual quedó a una concentración final de 0.282 M pH 8.8 con EDTA 2 mM. Ya polimerizado el gel separador, se añadió en el espacio

restante el gel concentrador que contenía acrilamida 5%, N,N-metilenbis-acrilamida 0.016%, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1%, TEMED 0.15% disueltos en amortiguador de trizma 0.1M pH 6.6 con EDTA 2 mM. Inmediatamente después de poner la mezcla del gel concentrador se colocó el molde formador de pozos. Ya polimerizados los geles, se montó la cámara de electroforesis y se agregó el amortiguador de corrida que contenía Trizma 0.025M pH8.3, Glicina 0.192M y SDS 0.1%. A las proteínas, que se disolvieron en amortiguador de muestra, se les agregó 1 μ l de azul de bromofenol al 0.2% y se hirvió por 1 minuto, se centrifugó por 30 segundos a 16000 x g y la proteína preparada se colocó en los pozos del gel. Se colocaron 70 μ g ó 30 μ g de proteína por pozo, para pozos de 7 mm y 3 mm de ancho respectivamente. Inicialmente, la corrida electroforética se realizó a 50 volts para concentrar la muestra; cuando el frente llegó a nivel del gel separador, la corrida se llevó a cabo a 100 volts. Cuando el colorante o frente de corrida llegó aproximadamente 0.5 cm antes del extremo inferior del gel se dió por concluída la electroforesis.

6.3. Tinción de geles de poliacrilamida.

Concluída la electroforesis, se sacó el gel y se sumergió en solución teñidora, la cual estaba compuesta por

azul de coomassie al 1% en metanol al 50% y ácido acético al 10% en agua bidestilada. Después de una hora de agitación constante, se retiró el colorante y el gel se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de solución teñidora. El gel se destiñó con una solución de metanol al 50%, ácido acético al 10% en agua destilada. La solución desteñidora se cambió cada vez que se saturó con colorante hasta que aparecieron algunas bandas en el gel, inmediatamente después el gel se transfirió a un recipiente que contenía ácido acético al 10%, esta solución se cambió en varias ocasiones hasta que el fondo del gel adquirió un color azul muy tenue o transparente. El gel se lavó con abundante agua corriente para eliminar el exceso de ácido acético y se puso a secar entre dos hojas de papel celofán previamente húmedas, montadas en un bastidor de acrílico y sujeto por pinzas a los lados. El secado del gel se realizó a temperatura ambiente, durante 48 horas. Pasado ese tiempo se desmontó el bastidor y se cortó el exceso de papel celofán.

7. RECONOCIMIENTO DE PROTEINAS DEL PATRON TOTAL DE PROMASTIGOTES (TRANSFERIDAS A PAPEL DE NITROCELULOSA), CON SUERO POLICLONAL ANTI-*Leishmania*.

7.1. Electrotransferencia de proteínas totales de promastigotes a papel de nitrocelulosa.

La electrotransferencia se realizó de acuerdo a

Towbin y col., (1979).

Terminada la electroforesis, el gel se saco del molde y se sumergió por 10 minutos en una solución de trizma 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M y metanol al 20% (Amortiguador de transferencia). Pasados los 10 minutos, la cámara de Transferencia (Idea Scientific, modelo Genie) se montó de la siguiente manera: primero se puso una malla de plástico sobre la cual se colocó el electrodo negativo, en seguida se pusieron tres fibras de material inerte previamente húmedas con el amortiguador de transferencia y sobre éstas una hoja de papel filtro (Whatman No.3). Sobre el papel filtro se colocó el gel y sobre éste el Papel de nitrocelulosa (PNC, Hoefer Scientific Instruments 0.45 μm de diametro del poro) junto con otra hoja de papel filtro. Se tuvo cuidado de no hacer y dejar burbujas entre el gel y el PNC. Sobre el papel filtro se pusieron tres fibras de material inerte previamente húmedas, el electrodo positivo y finalmente la malla de plástico. La transferencia se realizó durante 50 minutos a 12 volts y 500 mA. Concluida la electrotransferencia, la cámara se desmontó y el papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con albúmina al 3%, gelatina al 0.1% en PBS-Tween 0.05% con azida de sodio al 0.1%. El PNC se lavó una vez con PBS-Tween 0.05%, se dejó secar y se almacenó en el congelador hasta su uso.

7.2. Inmunodetección de proteínas del patrón total de promastigotes con suero policlonal anti-*Leishmania*.

El papel de nitrocelulosa con proteínas totales de promastigotes transferidas, bloqueado y lavado con PBS-Tween 0.05%, se cortó longitudinalmente en tiras delgadas de 3 mm de ancho. Las tiras se colocaron individualmente en tubos con tapa de rosca, donde se agregaron 2 ml (por tubo) del suero de conejo anti-*Leishmania* diluido 1/100, 1/200, 1/500 y 1/1000 en PBS-Tween 0.05% -suero bovino al 1%. Las tiras de papel de nitrocelulosa se incubaron toda la noche a 4 °C. Terminada la incubación, las membranas de nitrocelulosa se lavaron con PBS-Tween 0.05% y se incubaron por 5 horas en oscuridad y a 4 °C con Anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, diluido 1/1250 en PBS-suero bovino al 1%. Las membranas de nitrocelulosa se lavaron con PBS-Tween 0.05% y PBS. Posteriormente las proteínas inmunodetectadas por el suero policlonal se revelaron con una solución de 4-Cl-1-Naftol (3 mg/ml), H₂O₂ al 0.01% en PBS. Ya reveladas las proteínas, la reacción se detuvo lavando las tiras de papel con agua destilada. El papel de nitrocelulosa se secó sobre papel filtro Whatman No. 3.

Nota: En el ensayo control se utilizó como primer anticuerpo, suero preinmune de conejo, diluido 1/100, 1/200, 1/500, y 1/1000 en PBS-Tween 0.05%-suero bovino al 1%.

V. RESULTADOS.

1.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*.

Después de tres meses y medio de haber comenzado a inmunizar al conejo, se obtuvo el suero inmune anti-*Leishmania* y para probar la positividad del mismo se "Tituló" con la prueba de ELISA. Se analizaron las diluciones 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 y 1/1000, tanto para el suero preinmune como para el suero anti-*Leishmania*.

Como se observa en la tabla 1, los valores de densidad óptica a 492 nm, obtenidos para el suero preinmune fueron de 0.000 para las diluciones 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500; y de 0.005 para las diluciones 1/25 y 1/1000. En base a estos resultados suponemos que el suero preinmune no reconoció moléculas del parásito. El valor de 0.005 nos podría estar indicando únicamente, el rango de error del lector donde se leyeron las muestras. Comparando los valores de densidad óptica del suero inmune con respecto al suero preinmune del conejo, se observó que el suero anti-*Leishmania* reconoció componentes del parásito cuando se utilizó a las diluciones 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500. El valor obtenido para la dilución 1/1000 fue cercano a los valores del suero preinmune, lo que nos indicó que el suero anti-*Leishmania*

TABLA 1

PRUEBA DE POSITIVIDAD DEL SUERO POLICLONAL ANTI-*Leishmania*,
 PRODUCIDO EN CONEJO, MEDIANTE EL METODO DE ELISA.

DILUCION PROBADA.	VALORES DE DENSIDAD OPTICA (492 nm)	
	SUERO PREINMUNE DE CONEJO.	SUERO INMUNE DE CONEJO.
1/25	0.005	1.55 *
1/50	0.000	1.09 *
1/100	0.000	0.80 *
1/200	0.000	0.40 *
1/500	0.000	0.15 *
1/1000	0.005	0.04

* Valores considerados positivos a la prueba de ELISA.

lo diluimos tanto que escasamente reconoce alguna(s) molécula(s) del parásito.

Al analizar los datos de la tabla 1, consideramos que las diluciones 1/100 y 1/200 eran las apropiadas para nuestro sistema.

Por lo tanto, los resultados obtenidos con la prueba de ELISA proporcionaron una aproximación de la dilución óptima para utilizar el suero anti-*Leishmania*.

2. LOCALIZACION DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR EL SUERO POLICLONAL ANTI-*Leishmania* EN PROMASTIGOTES DE *L. mexicana* CRECIDOS EN CULTIVOS *in vitro*.

Con la finalidad de conocer la localización de los componentes del parásito reconocidos por el suero policlonal, se procedió a incubar a los promastigotes con dicho suero (anti-*Leishmania*). Para revelar los sitios de unión de este suero, se utilizó un suero anti-IgG de conejo conjugado con Fluoresceina (FITC).

Debido a que en la prueba de ELISA se utilizó extracto total del parásito para el reconocimiento de moléculas con el suero inmune y, en este ensayo se utilizaron parásitos completos, se decidió probar el suero inmune a las diluciones 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500 (positivas en la prueba de ELISA).

Se observó que la marca fluorescente de los

parásitos incubados con el suero inmune diluido, 1/25 y 1/50 fue tan intensa que no permitió distinguir con exactitud en que parte del parásito se localizó la marca, es decir, que sitios del parásito había reconocido el suero.

En la dilución 1:100, la marca fluorescente disminuyó en intensidad, sin embargo fue más nítida. En este ensayo observamos que la marca se localizó, exclusivamente, en la superficie celular del parásito así como en su flagelo.

En la dilución 1:200, la marca fluorescente que se observó fue poco intensa y por lo tanto poco perceptible, sin embargo, la marca fluorescente se localizó en la membrana celular del parásito y en el flagelo del mismo.

Con estos resultados, se logró determinar que la dilución óptima para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta con el suero inmune fue 1:100 y que el suero reconoció componentes de la superficie celular así como del flagelo del parásito. Figura 1.

En los controles negativos, en los cuales se utilizó suero preinmune de conejo a las diluciones correspondientes con los experimentales no se observó marca fluorescente en los parásitos, lo cual nos indicó que el suero inmune reconoció específicamente componentes del parásito.

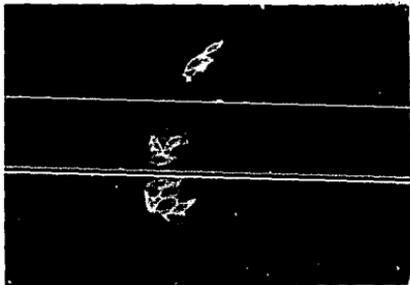


FIGURA 1.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE ANTIGENOS RECONOCIDOS EN PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*. LOS PROMASTIGOTES FUERON INCUBADOS CON SUERO POLICLONAL ANTI-*Leishmania* Y POSTERIORMENTE CON SUERO ANTI-IgG CONJUGADO CON FITC. OBSERVE QUE LA MARCA FLUORESCENTE ESTA A NIVEL DE LA SUPERFICIE CELULAR Y EN EL FLAGELO DEL PARASITO.

3. SEGUIMIENTO DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS EN PROMASTIGOTES POR EL SUERO ANTI-*Leishmania*, DURANTE SU INTERNALIZACION A MACROFAGOS, EN CULTIVOS *in vitro*.

Con la finalidad de llevar a cabo el seguimiento de algunos antígenos del promastigote durante su internalización en el macrófago, se utilizó el suero inmune anti-*Leishmania* en los ensayos de interacción.

Concluidos los diferentes tiempos de interacción promastigotes-macrófagos (2, 5, 24 y 48 horas), se llevó a cabo la inmunodetección de antígenos de los parásitos, mediante el uso de suero policlonal anti-*Leishmania* y anti-IgG de conejo conjugado con Fluoresceina (FITC).

A las dos horas de interacción se observó a un gran número de parásitos libres en el medio de cultivo y algunos ya habían establecido contacto con los macrófagos. Como se puede observar en la figura 2-A, el suero anti-*Leishmania* reconoció componentes de la membrana celular y flagelo de parásitos libres o unidos al macrófago. Por otra parte se observó que la unión entre las leishmanias y los macrófagos, en general se realizó mediante el flagelo del parásito y la membrana del macrófago.

A las cinco horas de interacción, un mayor número de promastigotes ya habían establecido contacto con los macrófagos y, al igual que en la interacción de dos horas, varias leishmanias nadaban libremente en el medio de cultivo. El suero anti-*Leishmania* reconoció exclusivamente

componentes de la superficie membranal así como del flagelo de leishmanias libres y adheridas a los macrófagos, los que previamente fueron permeabilizados antes de incubar con el suero policlonal. Figura 2-B.

En las interacciones de 24 horas, los parásitos sólo se observaron dentro de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos que los fagocitaron. No se observaron parásitos libres en el medio de cultivo debido a que las leishmanias que no establecieron contacto con los macrófagos después de seis horas de interacción, fueron retiradas cuando estos cultivos fueron lavados con medio fresco. El suero anti-*Leishmania* reconoció únicamente componentes de los parásitos. La marca fluorescente se observó dentro de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos permeabilizados con acetona fría. Figura 2-C.

En las interacciones de 48 horas, al igual que lo observado en las interacciones de 24 horas, el suero policlonal reconoció componentes del parásito, es decir, la marca fluorescente se observó dentro de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos infectados, permeabilizados con acetona fría. La forma y tamaño de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos infectados fue homogénea, caso contrario al observado en las interacciones de 24 horas. Figura 2-D.

Para cada tiempo de interacción se realizaron ensayos controles, los cuales se pusieron a incubar con

FIGURA 2.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS EN PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*, DURANTE SU INTERNALIZACION A MACROFAGOS. LAS INTERACCIONES SE REALIZARON A DIFERENTES TIEMPOS: A) 2 HORAS. B) 5 HORAS. C) 24 HORAS. D) 48 HORAS. LAS PREPARACIONES SE INCUBARON CON SUERO ANTI-*Leishmania* Y POSTERIORMENTE CON ANTI-IgG CONJUGADO A FITC. OBSERVE QUE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS, SE LOCALIZAN PRINCIPALMENTE EN LA SUPERFICIE MEMBRANAL Y FLAGELO DE LOS PARASITOS. ESTA FLUORESCENCIA NO SE PIERDE AUN CUANDO LOS PARASITOS HAN COMENZADO A DIFERENCIARSE DE PROMASTIGOTES A AMASTIGOTES EN LA VACUOLA PARASITOFORA.

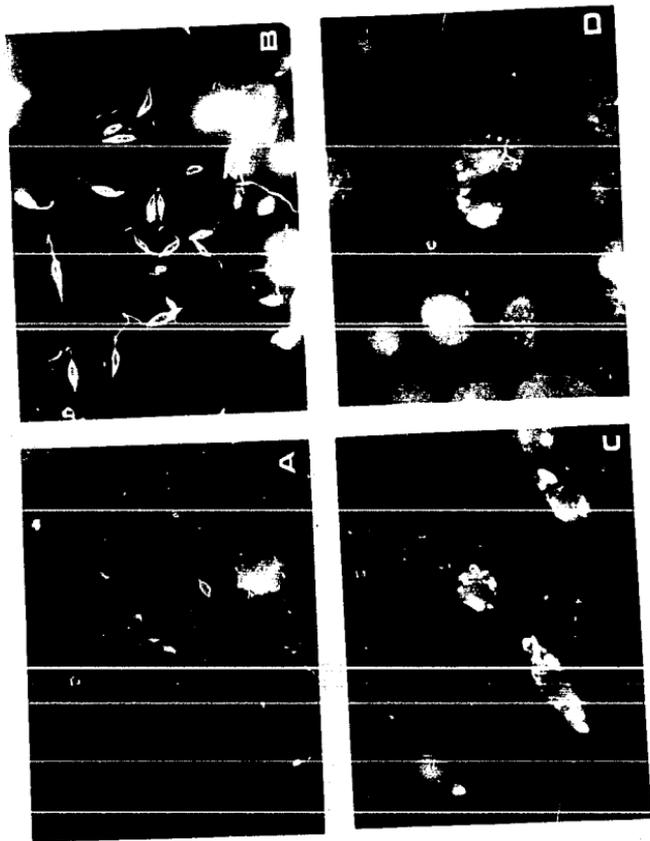


FIGURA 2.

suero normal

de conejo (a las mismas diluciones utilizadas para los experimentales) y anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína. En cada caso, el suero preinmune no reconoció componentes del parásito.

4. OBTENCION DEL PATRON TOTAL DE PROTEINAS DE PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*.

El patrón electroforético de proteínas totales de promastigotes, obtenido bajo nuestras condiciones, mostró un total de 55 proteínas cuyos pesos moleculares oscilan entre 13 a 138 kDa. De las 55 bandas teñidas con azul de coomassie una es la más evidente (quizá sea la proteína más abundante en el parásito), posee un peso molecular aproximado de 53 kDa. Por otra parte, las proteínas del patrón electroforético con pesos moleculares mayores de 83 kDa fueron escasas y muy tenues. Esta metodología nos permitió una buena visualización de proteínas cuyos pesos moleculares están entre 13 y 83 kDa. Figura 3.

Los pesos moleculares aproximados de las proteínas más evidentes y quizá las más abundantes del parásito, que se observan en el patrón total son: 80, 61, 53, 45, 41, 27, 22, 16, 15, 14 y 13 kDa. Figura 3.

En la Tabla 2 se muestran los pesos moleculares de

las proteínas del patrón total de promastigotes, observadas en geles de poliacrilamida al 10% y teñidos con azul de coomassie.

5. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR EL SUERO POLICLONAL, DEL PATRON TOTAL DE PROTEINAS DEL PROMASTIGOTE.

Ya obtenido el patrón electroforético, las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC) para posteriormente llevar a cabo el reconocimiento de antígenos del patrón total de proteínas de promastigotes con el suero policlonal anti-*Leishmania*. Se probaron cuatro diferentes diluciones del suero inmune, 1:100, 1:200, 1:500 y 1:1000. Se observó que dicho suero reconoció proteínas diferentes dependiendo de la dilución utilizada, es decir, cuando se utilizó una dilución 1:100 se reconocieron 35 proteínas cuyos pesos moleculares oscilan entre 23 y 136 kDa. A medida que se aumentó la dilución del suero el número de bandas reconocidas también disminuyó. Las proteínas que fueron reconocidas por el suero diluido 1:100 y que no fueron reconocidas por el suero a mayor dilución son las que tienen pesos moleculares que oscilan entre 23 y 33 kDa.

Por los patrones obtenidos del reconocimiento de proteínas con el suero policlonal podemos sugerir que dicho suero tiene mayor afinidad por proteínas cuyos pesos

moleculares aproximados son de 74, 70, 68, 63, 61, 49 y 45 kDa, debido a que se observan muy intensas en el papel revelado. También se observan otras proteínas menos evidentes y por lo tanto, menos afines al suero. Figura 3.

Al comparar el patrón de proteínas totales teñido con azul de coomassie y el patrón de proteínas reconocidas por el suero inmune anti-*Leishmania*, se observó que muchas proteínas tuvieron mejor definición y fueron más evidentes cuando se utilizó el suero para revelarlas que cuando fueron teñidas con azul de coomassie. La proteína que en los geles es la más evidente y ancha, proteína de 53 kDa, también fue revelada por el suero inmune, sin embargo, se observó como una banda poco evidente. Por el contrario, dos proteínas cuyos pesos moleculares aproximados fueron de 60 y 61 kDa, las cuales se observaron como bandas poco evidentes en geles teñido con azul de coomassie, fueron proteínas muy evidentes y bien definidas reconocidas por el suero policlonal.

El control negativo consistió en poner a incubar el papel de nitrocelulosa con proteínas totales de promastigotes transferidas, con suero preinmune de conejo a las mismas diluciones que se utilizó el suero inmune (1/100, 1/200, 1/500 y 1/100). En ninguno de los ensayos el suero normal de conejo reconoció proteína alguna del patrón total de proteínas, por lo que nosotros suponemos que el suero producido en el conejo realmente reconoció componentes de promastigotes.

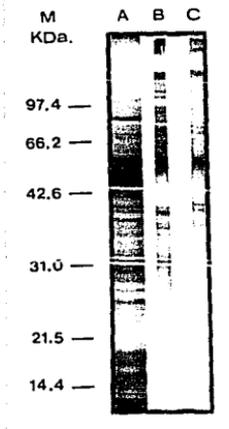


FIGURA 3.

PROTEINAS RECONOCIDAS POR EL SUERO POLICLONAL ANTI-*Leishmania*, DEL PATRON TOTAL DE PROMASTIGOTES. M: MARCADORES DE PESO MOLECULAR. A: PATRON TOTAL DE PROTEINAS DE PROMASTIGOTES, TEÑIDO CON AZUL DE COOMASSIE. B: PROTEINAS RECONOCIDAS POR EL SUERO POLICLONAL, DILUCION 1/100. C: PROTEINAS RECONOCIDAS POR EL SUERO POLICLONAL, DILUCION 1/200.

TABLA 2.

PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS DEL PATRON TOTAL DE
 PROMASTIGOTES DE *L. mexicana*, EN GELES DE
 POLIACRILAMIDA-SDS.

Distancia.* (mm).	Rf. (mm).	P. M. Da.
1.27279	0.0145591	138547.0
1.34241	0.0153555	138278.0
2.07778	0.0237673	135473.0
4.6182	0.0526265	126215.0
5.12795	0.0586575	124434.0
7.02898	0.0804028	118014.0
7.36024	0.0841921	116930.0
8.63277	0.0987483	112856.0
9.38988	0.107409	110500.0
11.3181	0.129466	104719.0
12.6802	0.145046	100819.0
13.8294	0.158192	97641.2
15.707	0.179668	92664.0
17.4863	0.200022	89181.4
17.5217	0.200426	88094.5
18.7638	0.214634	85097.5
19.4154	0.222088	83566.2
20.8151	0.238099	80369.5
21.7461	0.248749	78311.1
22.9581	0.262613	75710.5
23.599	0.269943	74370.4
25.7378	0.294409	70067.2
26.5928	0.304189	68417.6
28.3731	0.324553	65106.3
29.3646	0.335895	63332.0
30.4497	0.348307	61445.7
34.3047	0.392403	58187.1
35.7785	0.409262	53589.5
36.4381	0.416807	52001.8

37.6578	0.430759	50264.0
37.9169	0.433723	49902.4
40.0579	0.458213	47012.2
40.1616	0.459399	46876.5
41.4634	0.47429	45206.5
42.7061	0.488505	43667.8
44.6356	0.510576	41381.9
46.9957	0.537573	38747.9
48.7273	0.55738	36922.6
50.6484	0.579356	34997.9
51.6393	0.59069	34044.7
53.7185	0.614473	32128.3
55.5724	0.63568	30510.6
57.1111	0.65328	29230.0
59.58	0.681522	27286.6
62.0226	0.709463	25491.1
64.8026	0.741262	23590.9
65.9545	0.754439	22845.7
67.4981	0.772095	21883.8
69.8066	0.798502	20520.4
72.3455	0.827543	19118.8
74.2675	0.849529	18121.7
77.1648	0.88267	16716.1
79.7286	0.911997	15563.5
81.738	0.934982	14716.0
85.7159	0.980484	13171.9

* Distancia recorrida por la proteína en el gel de poliacrilamida-SDS. Medida dada en mm.

VI DISCUSION.

Se ha propuesto que para el establecimiento del parasitismo intracelular de las leishmanias, es necesario que se lleven a cabo cuatro eventos secuenciales: Reconocimiento e interacción de las leishmanias con los macrófagos, endocitosis de los parásitos por los macrófagos, sobrevivencia y diferenciación de los parásitos dentro de los fagocitos mononucleares y, finalmente su proliferación en los macrófagos. Cada uno de estos eventos es igualmente importante para el establecimiento del parasitismo, sin embargo, el que más ha llamado nuestra atención es el de sobrevivencia y diferenciación de los parásitos dentro de los macrófagos. Este evento es especialmente interesante debido a que se sabe que los macrófagos son células especializadas para la destrucción de agentes patógenos o extraños a nuestro organismo. El cómo los parásitos de este género evaden la actividad de los macrófagos aún no es clara, sin embargo, a la fecha se plantean dos hipótesis que tratan de explicar este fenómeno. Una de las hipótesis propone que las leishmanias poseen una cubierta, formada por moléculas de su superficie, que evitan el que las enzimas lisosomales degraden a los parásitos y la segunda hipótesis sugiere que los parásitos liberan factores de secreción que inhiben la actividad de las enzimas lisosomales.

Con la finalidad de llevar a cabo el seguimiento de antígenos de promastigotes durante su internalización a macrófagos y su posible participación en la sobrevivencia se realizó el presente trabajo que involucra ensayos de interacción *Leishmania*-macrófago y reconocimiento de antígenos durante su interacción e internalización con el uso de anticuerpos policlonales anti-*Leishmania*.

Cuando se realizó la prueba de ELISA para "titular" al anticuerpo producido, nos dimos cuenta que el título del anticuerpo inmune era bajo (1/100). Inmediatamente tuvimos la inquietud de ver que parte de los parásitos nos estaba reconociendo el suero, de ahí que se realizó el reconocimiento de antígenos en promastigotes cultivados *in vitro*.

A pesar de que la prueba de ELISA nos había dado una aproximación de la dilución a la cual se podía usar el suero inmune, decidimos trabajar con dos diluciones por debajo y dos por arriba de la "óptima". Esta idea surgió debido a que se desconocía a que moléculas en especial reconocería el suero, es decir, por qué moléculas del parásito tendría mayor afinidad (moléculas de la membrana plasmática, flagelo, citoplasma u organelos).

Los resultados obtenidos en este ensayo nos sugirieron que al parecer, el suero inmune anti-*Leishmania*, reconoce preferencialmente moléculas de la superficie membranal y flagelo de los parásitos. Sin embargo, debido a

que los anticuerpos son moléculas grandes que no pueden pasar al citoplasma de las leishmanias a través de su membrana celular, por el momento no pudimos descartar la posibilidad de que el suero reconociera moléculas del citoplasma u organelos de los parásitos. En base a lo anterior, se decidió llevar a cabo una permeabilización de la membrana de los parásitos, utilizando acetona fría (la finalidad de la permeabilización es solubilizar lípidos de la superficie celular y así permitir la entrada libre de moléculas grandes al citoplasma), no obstante, la permeabilización se realizó cuando se hicieron los ensayos de seguimiento de antígenos durante la interacción *Leishmania*-macrófago.

Con los ensayos de interacción *Leishmania*-macrófago, confirmamos que el suero inmune anti-*Leishmania*, reconoce específicamente moléculas de la superficie celular y flagelo de los parásitos. Este hecho se basa en lo siguiente:

El procesamiento de los ensayos de 2 horas de interacción fue igual que el realizado para los ensayos de localización de antígenos reconocidos por el suero inmune en promastigotes, de tal manera que no se esperaba cambio alguno en los resultados, sin embargo, en el procedimiento de los ensayos de interacción de 5, 24 y 48 horas, se realizó la permeabilización de las células (leishmanias y macrófagos); hasta ese momento supimos que el suero únicamente reconoció, moléculas de la membrana y flagelo, y

no moléculas del citoplasma u organelos del parásito.

En resumen, el suero policlonal anti-*Leishmania* reconoce exclusivamente moléculas del parásito y en especial, moléculas de la superficie celular y flagelo de las leishmanias.

En los ensayos de 24 horas de interacción, el suero policlonal reconoció moléculas sobre el parásito, sin embargo la marca fluorescente, aunque difusa, se observó también en toda la vacuola parasitófora. Este resultado podría sugerir al menos tres cosas:

a: Que el suero policlonal puede estar reconociendo moléculas de la superficie de los parásitos endocitados por los macrófagos.

b: Que el suero inmune quizá reconozca moléculas que el parásito libera en la vacuola parasitófora. Esta posibilidad existe si consideramos los trabajos realizados por Alexander y Vickerman (1975), El-On y col. (1980), y Hernández y col. (1981), quienes observaron que las leishmanias liberan al medio extracelular factores de secreción (que son moléculas que formaban parte de la superficie celular del parásito), que probablemente estén involucrados en inhibir la acción de las enzimas lisosomales de las vacuolas parasitóforas y por lo tanto, en dar protección al parásito para su sobrevivencia dentro de los macrófagos; suponemos que la marca fluorescente libre en la vacuola podría deberse a que el suero reconoció estos

factores.

c: Que el suero puede tener reacción cruzada con las enzimas lisosomales vertidas a la vacuola parasitófora.

Aunque estas tres posibles explicaciones pueden ser factibles, hacen falta algunos experimentos para probarlas.

En los ensayos de 48 horas de interacción, el suero policlonal continuó reconociendo algunas o quizá todas las moléculas que reconocía en los experimentos de 2, 5 y 24 horas de interacción. La marca fluorescente se observó dentro de las vacuolas parasitóforas, sin embargo, la marca se localizó sobre la superficie celular de los parásitos que tenían aproximadamente 40 horas dentro de las vacuolas de los macrófagos, (tiempo al cual los promastigotes han comenzado a diferenciarse de promastigotes a amastigotes). Si consideramos el trabajo realizado por Chang en 1981, quien observó que moléculas marcadas de la superficie de los parásitos, con pesos moleculares aproximados de 68 y 43 KDa, persistieron por más de 36 horas sin que fueran degradadas dentro de los macrófagos infectados con los parásitos, entonces nuestros resultados nos sugieren, la posible existencia de moléculas en la superficie de promastigotes que no se modifican en las primeras horas de su diferenciación y que posiblemente estén protegiendo al parásito contra la acción de las enzimas lisosomales, sin embargo, no podemos decir, si estas moléculas cambian o no una vez que el parásito se ha diferenciado totalmente.

En 1981, Berman y Dwyer observaron que los parásitos del género *Leishmania* insertan moléculas de su superficie a la superficie membranal de los macrófagos que los endocitan y, sugirieron que esto podría ser un mecanismo de evasión de los parásitos para sobrevivir dentro de los macrófagos, sin embargo, bajo nuestras condiciones en ninguna de las preparaciones de interacción, el suero policlonal reconoció moléculas de la membrana de los macrófagos infectados, por lo que nuestros resultados contradicen esta suposición.

Con la finalidad de conocer que moléculas del parásito fueron reconocidas por el suero policlonal, es decir, comenzar a caracterizarlas conociendo sus pesos moleculares, se procedió a incubar el suero policlonal con proteínas totales de promastigotes, transferidas a papel de nitrocelulosa. Nuestros datos mostraron que el suero policlonal reconoció 35 proteínas del patrón total, siendo 7 las más evidentes. Si consideramos los trabajos realizados por Fong y Chang (1982); Colomer-Gould y col. (1985); Bouvier y col. (1985); Russell y Wilhelm (1986); Kweider, M (1987) y Wright y El Amin (1989), quienes sugirieron que el principal antígeno de la superficie celular del parásito es la glicoproteína de 63 KDa y, nuestros resultados de localización de antígenos reconocidos por el suero policlonal anti-*Leishmania*, era de esperarse que la proteína más evidente revelada en el papel de nitrocelulosa fuera la glicoproteína de 63 KDa, o una molécula con un peso

molecular cercano al de la gp63, sin embargo, la proteína de 63 KDa fue reconocida, pero no fue la más evidente. Otra proteína que se ha reportado que es de membrana y muy antigénica es una de 43 KDa; en nuestro patrón se reconoció una de aproximadamente 45 KDa que forma parte del grupo de las más evidentes, así es que podría tratarse de la misma molécula. Finalmente estos resultados nos sugieren que el policlonal es poco afín a estos antígenos principales del parásito, lo cual quizá se deba a que si el suero reconoce o tiene mayor afinidad por la estructura terciaria de estas proteínas y, como las proteínas transferidas a PNC han perdido su estructura terciaria, entonces el suero no las reconozca eficientemente. Esta suposición se basa en los resultados obtenidos por Bouvier y col. en 1985, quien observó que la glicoproteína de 63 KDa (proteína integral de la membrana plasmática de *Leishmania*, puede transformarse en una molécula hidrofílica durante su purificación, lo cual quizá se deba a la hidrólisis del lípido que es el punto de anclaje de la proteína a la membrana. Con estos resultados no se puede decir que todas las proteínas reconocidas por el suero sean exclusivas de la membrana y flagelo de los promastigotes.

VII. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvo un suero policlonal específico contra componentes de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

2. El suero policlonal reconoció únicamente componentes de membrana plasmática y flagelo del parásito, aún cuando los promastigotes comenzaban a diferenciarse a amastigotes.

3. El suero policlonal tuvo mayor afinidad por proteínas con pesos moleculares de 74, 70, 68, 63, 61, 49 y 45 kDa.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- Alexander, J. (1975). Effect of the antiphagocytic agent citochalasin B on macrophage invasion by *Leishmania mexicana* promastigotes and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Journal of Protozoology. 22: 237-240.
- Alexander, J. y Vickerman, K. (1975). Fusion of Host cell Secondary lysosomes with the Parasitophorus Vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected Macrophages. Journal of Protozoology. 22 (4): 502-508.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore D. D., Seidman, J-G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1985). Analysis of proteins: Colorimetric methods. En: Current Protocols in Molecular Biology. Vol 2. Ed. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. Boston. pp. 10.1-10.3.
- Berman, J. D. y Dwyer, D. M. (1981). Expression of *Leishmania* Antigen on the Surface Membrane of Infected Human Macrophages *in vitro*. Clinical Experimental Immunology. 44: 342.
- Blackwell, J., Ezekowitz, A., Roberts, M., Channon, J., Sin, R. y Gordon, S. (1981). Macrophage Complement and Lectin-like receptor binding *Leishmania* in the absence of serum. Journal Experimental Medicine. 162: 324.
- Blackwell, J. M. y Alexander, J. (1983). The macrophage and parasitic protozoa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77 (5): 636-645.

- Bouvier, J., Etges, R. J. y Bordier, C. (1985). Identification and Purification of Membrane and Soluble Forms of the Major Surface Protein of *Leishmania* Promastigotes. Journal of Biological Chemistry. 260 (29): 15504-15509.
- Bray, R. S. (1983). *Leishmania mexicana mexicana*: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages *in vitro*. Journal of Protozoology. 30: 322-329.
- Brown, W. A. y Neva, F. A. (1983). Blood and Tissue Protozoa of Human Beings. En: Basic Clinical Parasitology. Ed. Apleton-Century-Crofts. New York. pp. 55-76.
- Clamp, J. R., Hughes, K. W., y Mc Pherson, J. C. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochimistry. 8: 871-879.
- Colomer-Gould, V., Quintao, G. L., Keithly, J. y Nogueira, N. (1985). A common major surface antigen on amastigotes and promastigotes of *Leishmania* species. Journal of Experimental Medicine. 162: 902-916.
- Chance, M. L. (1981). The six Diseases of WHO. British Medical Journal. 283 (7): 1245-1247.
- Chang, K.-P. y Dwyer, D. M. (1976) Multiplication of a Human Parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of Hamster Macrophages *in vitro*. Science. 193: 678-680.
- Chang, K.-P. (1980). Human Cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: Propagation and Isolation of intracellular parasites. Science. 209: 1240-1242.

- Chang, K-P. (1981). *Leishmania donovani*-macrophage binding mediated by surface glycoproteins antigens: Characterization in vitro by a radioidotopic assay. Molecular Biochemical Parasitology. 4: 67.
- Chang, K.-P. y Fong, D. (1982). Antigenic Changes During Intracellular Differentiation of *Leishmania mexicana* in Cultured Macrophages. Infection and Immunity. 36 (1): 430-431.
- Chang, K-P. (1983). Cellular and Molecular Mechanisms of Intracellular Symbiosis in Leishmaniasis. International Review of Cytology Supplement. 14: 267-302.
- Chang, K-P., Fong, D. y Bray, R. S. (1985). Biology of *Leishmania* y Leishmaniasis. En: Chang, K-P. y Bray., R. S. Leishmaniasis. Vol 1. Ed. Elsevier Science Publishers. New York. pp. 1-29.
- Chang, C. S. y Chang, K.-P. (1986). Monoclonal antibody affinity purification of *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. Proceeding of the National Academy of Science of the U.S.A. 83: 100-104.
- Decker-Jackson, J. E. y Honigberg, B. M. (1978). Glycoproteins Released by *Leishmania donovani*: Immunologic Relationship with Host and Bacterial Antigens and Preliminary Biochemical Analysis. Journal of Protozoology. 25 (4): 514-525.
- El-On, J., Bradley, D. J. y Freeman, J. C. (1980) *Leishmania donovani*: Action of Excreted Factor on Hydrolytic Enzyme Activity of Macrophages from mice with genetically Different Resistance to Infection. Experimental Parasitology. 49: 167-174.

- Fong, D. y Chang, K.-P. (1981). Tubulin biosynthesis in the developmenta cycle of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Changes during differentiation of motile and nonmotile stages. Proceeding of the National Academy of Science of the U.S.A. 78 (2): 7624-7628.
- Fong, D. y Chang, K.-P. (1982). Surface antigens change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: identification by monoclonal antibodies. Proceeding of the National of Academy of Science of the U.S.A. 79: 7366-7370.
- Handman, E. y Greenblatt, C. L. (1977). Promotion of leishmanial infections in non-permissive host macrophages by conditioned medium. Zeitschrift fur Parasitenkunde. 53: 143-149.
- Handman, E. y Spira, D. T. (1977). Growth of *Leishmania amastigotes* from normal and immune mice. Zeitschrift fur Parasitenkunde. 53: 75-81.
- Handman, E., Mitchell, G. y Goding, J. (1981). Identification and Characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. Journal of Immunology. 126: 508-512.
- Handman, E. y Hocking, R.E. (1982). Stage-Specific, Stain-Specific and Cross-Reactive Antigens of *Leishmania* Species Identified by Monoclonal Antibodies. Infection and Immunity. 37 (1): 28-33.
- Handman, E. y Goding, J. (1985). The *Leishmania* receptor for macrophages in a lipid containing glycoconjugate. The EMBO Journal. 4: 329-336.
- Hart, D. T., Vickerman, K. y Coombs, G. H. (1981). A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. Parasitology. 82: 345-355.

Hendricks, L. D., Wood, D. E. y Hajduk, M. E. (1978). Hemoflagelates: commercially available liquid media for rapid cultivation. Parasitology. 76: 309-316.

Hernández, A. G., Argüello, C., Dagger, F., Infante, R. B., Stojanovich, D., Dawidowicz, K., Riggione, F. y La Riva, G. (1981). The Surface Membrane of *Leishmania*. En: Slutzky, G. M. The Biochemistry of Parasites. Ed. Pergamon Press Oxford. New York. pp. 47-65.

Hutt, M. S. R., Köberle, F. y Salfelder, K. (1973). Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: Spencer, H. Tropical Pathology. Ed. Springer-Verlag New York Heidelberg Berlin. New York. pp. 351-398.

Kahl, L. P. y MacMahon-Pratt, D. (1987). Structural and Antigenic Characterization of a Species-and promastigote-Specific *Leishmania mexicana amazonensis* Membrane Protein. Journal of Immunology. 138 (5): 1587-1595.

Kutish, G.F. y Janovy, J. (1981). Inhibition of *in vitro* macrophage digestion capacity by infection with *Leishmania donovani*. Journal of Parasitology. 67 (4): 457-462.

Kweider, J. M., Lesmesre, J., Darcy, F., Kusnierz, J. P., Capron, A. y Santoro, F. (1987). Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. Journal of Immunology. 138: 299.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. Journal of Protozoology. 27 (1): 37-58.

Lewis, D. H. y Peters, W. (1977). The resistance of intracellular Leishmania parasites to digestion by lysosomal enzymes. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 71: 295-312.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.

Manson-Bahr, P. E. C. y Apter, F. J. C. (1982). Leishmaniasis y Medical Protozoology. En: Manson's Tropical Diseases. Ed. Bailliére Tindall. London. pp. 94-115 y 667-673.

Marr, J.J. (1984). The Chemotherapy of Leishmaniasis. En: Mansfield, J. M. Parasitic Diseases. Vol. 2. Ed. Marcel Dekker, INC. New York. pp. 201-229.

Mosser, D. y Edelson, P. (1984). Activation of the alternative complement pathway by Leishmania promastigotes: parasites lisis and attachment to macrophages. Journal of Immunology. 132: 1501.

Nogueira, N., Chaplan, S., Tydings, J. D., Unkeless, J. y Cohn, Z. (1981). Trypanosoma cruzi: surface antigens of blood and culture forms. Journal of Experimental Medicine. 153: 629-639.

Olsen, W. O. (1974). Phylum Protozoa. En: Animal Parasites, Their Life Cycles and Ecology. Ed. University Park Press. Baltimore. pp. 1-134.

Person, R. D., Wheeler, D. A., Harrison, L. H. y Kay, D. (1983). The Immunology of Leishmaniasis. Review of Infectious Diseases. 5 (5): 907-927.

Rodríguez, N., Hernández, A. G., y Merino, F. (1983). Effect of a Purified Excreted Factor from *Leishmania braziliensis* on Macrophage Activity. International Archives of Allergy Applications to Immunology. 72: 206-210.

Russell, D. y Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigote in attachment to macrophages. Journal of Immunology. 136: 2613-2620.

Schnur, L. F., Zuckerman, A. y Greenblatt, C. L. (1972). Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. Israel Journal of Medical Sciences. 8: 932-942.

Sleigh, M. (1979). Biología de los protozoarios. Ed. H. Blume. España. 339 pp.

Slutzky, G. H. y Greenblatt, C. L. (1979). Analysis by SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis of an Immunologically Active Factor of *Leishmania tropica* from growth media, Promastigotes, and Infected Macrophages. Biochemical Medicine. 21: 70-77.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceeding of the National Academy of Science of the U.S.A. 76: 4350-4358.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Williams, K. M., Sacchi, J. B. y Anthony, R. L. (1986). Identification and Recovery of *Leishmania* Antigen Displayed on the Surface Membrane of Mouse Peritoneal Macrophages Infected *in vitro*. The Journal of Immunology. 136 (5): 1853-1858.
- Wilson, H. y Pearson, R. (1986). Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a manose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. Journal of Immunology. 136: 4681.
- Wright, E. P. y El Amin, E. R. M. (1989). *Leishmania* infection: surfaces and immunity. Biochemistry and Cell Biology. 67: 525-536.
- Wyler, D. J. y Marsden, P. D. (1984). *Leishmaniasis*. En: Warren, K. S. y Mahmoud, A. A. F. Tropical and Geographical Medicine. Ed. Mc. Graw-Hill. U.S.A. pp. 270-280.
- Wyler, D., Syperk, J. y McDonal, J. (1985). *in vitro* parasite-macrophage interactions in human Leishmaniasis: Possible role of fibronectin in parasite attachment. Infection and Immunity. 49: 305.
- Zenian, A. (1981). *Leishmania tropica* biochemical aspects of promastigotes attachment to macrophage *in vitro*. Experimental Parasitology. 51: 175.
- Zuckerman, A. y Lainson, R. (1977). *Leishmania*. En: Kreier, J. P. Parasitic Protozoa. Vol. 1. Ed. Academic Press, INC. New York. pp. 33-58.