

146  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE GLICOPROTEINAS DE  
LA MEMBRANA PLASMATICA DE  
Leishmania mexicana AFINES A  
CONCAVALINA A.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
RAMOS GODINEZ MARIA DEL PILAR

MEXICO, D. F.

1993

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.

## INDICE:

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
Ciclo de vida	2
Morfología y citología de amastigotes y promastigotes	3
Relacion huesped parásito	5
Reconocimiento entre el parásito y el macrófago	5
Endocitosis de los parásitos por los macrófagos	7
La diferenciación del parásito en amastigotes	8
La proliferación	9
La sobrevivencia de los parásitos	10
Planteamiento del problema y objetivos	13
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>15</b>
Cultivo de promastigotes de <u>Leishmania mexicana</u>	15
Marcaje de la superficie celular de los promastigotes con Con A-FITC	15
Localización de glicoproteínas de la superficie celular de los promastigotes: Reacción con Con A-Peroxidasa	16
Control del marcaje de superficie de <u>Leishmania</u> sin la lectina	16
Identificación de citoeromo oxidasa en promastigotes de <u>Leishmania mexicana</u>	17
Obtención de proteínas de <u>Leishmania mexicana</u>	18
Electroforésis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	19
Transferencia de proteínas a PNC	20
Detección de glicoproteínas en geles de poliacrilamida	20
Detección de glicoproteínas en PNC	22
<b>RESULTADOS</b>	<b>23</b>
Localización de receptores de membrana a Con A	23
Proteínas totales de promastigotes de <u>Leishmania mexicana</u>	23
Glicoproteínas de promastigotes de <u>Leishmania mexicana</u>	24
Identificación de la estructura celular que presenta reacción de peroxidasa endógena	25
<b>DISCUSION</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>31</b>
<b>APENDICE</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>35</b>

## RESUMEN

De las enfermedades tropicales que afectan al hombre, encontramos que la OMS, reporta que la leishmaniasis ocupa el sexto lugar, a nivel mundial. Esta enfermedad es producida por un protozoario, el cual es transmitido al hombre por la picadura del mosquito Lutzomia. El parásito desarrolla estrategias para sobrevivir y continuar con su ciclo de vida en el hombre. Una de las estrategias que los investigadores han propuesto y en la que nos basamos es que Leishmania tiene glicoproteínas de la superficie membranal que son resistentes a los mecanismos microbicidas de los hospederos mamíferos. Además se ha propuesto que la presencia de estas glicoproteínas intervienen en la virulencia de algunas cepas de Leishmania, aunado a esto, en esta tesis se trabajó con una Leishmania cutánea difusa por lo que nos propusimos caracterizarla. Para ello, se utilizaron 8 diferentes lectinas y se determinó en el laboratorio que la Con A, es la que se presenta de manera más abundante en toda la membrana del parásito incluyendo el flagelo; esto se observó utilizando a la Con A conjugada con fluoresceína, además los parásitos se fraccionaron y se corrieron en geles de poliacrilamida y se realizaron transferencias a PNC, aquí conjugamos a la Con A con peroxidasa y DAB y encontramos que las glicoproteínas de 36, 38, 53, 70, 97, 122 y 118 presentan específicamente azúcares del tipo manosa o glucosa y además las glicoproteínas de 118 y 36 kDa no se encontró en los reportes de Leishmania mexicana, lo que representa una diferencia entre Leishmania mexicana mexicana y Leishmania mexicana pifanoi y creemos que es importante destacar cualquier diferencia que se encuentre entre cepas de Leishmania, lo cual tal vez pudiera servir como prueba para discernir entre cepas; como lo proponen Handman y Godin 1981, diciendo que pequeñas diferencias en la glicosilación pueden estar acompañadas en diferencias en el reconocimiento inmune entre cepas de Leishmania.

## IDENTIFICACION DE GLICOPROTEINAS DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE Leishmania mexicana AFINES A CONCAVALINA A.

### INTRODUCCION:

La Leishmaniasis, es una enfermedad producida por protozoarios del género Leishmania que afecta al hombre y se encuentra distribuida en las regiones selváticas de la mayor parte del mundo (Mansfiel, 1984). Los insectos de los géneros Phlebotomus o Lutzomyia son los responsables de la transmisión de la enfermedad (Brow y Neva, 1983; Mahmoud y Warren, 1977; Wilford, 1974).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Wright y El Amin 1989), la leishmaniasis es considerada como una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en salud pública mundial, no solo por su creciente magnitud, sino también por las consecuencias socioeconómicas y psicológicas que ocasiona en los pacientes.

Entre las especies de Leishmania que infectan al hombre se reconocen cuatro tipos diferentes entre sí (Brow y Neva, 1983; Mahmoud y Warren, 1977; Spencer 1973; Lumsden y Evans, 1976): Leishmania donovani, produce la leishmaniasis visceral o Kala-azar; Leishmania tropica, causa leishmaniasis cutánea ó úlcera oriental y Leishmania braziliensis y Leishmania mexicana, son los agentes etiológicos de las leishmaniasis cutánea-mucocutánea. Leishmania mexicana produce la enfermedad conocida como úlcera del chiclero (Brow y Neva, 1983) que se caracteriza por causar lesiones cutáneas, en la cara o miembros y se inicia como una pápula, que posteriormente se convierte en una úlcera con bordes elevados y endurecidos. Esta enfermedad afecta principalmente a trabajadores que colectan la goma de chicle, cacao café, en el sur del país (Velasco, 1987; Velasco et al., 1989).

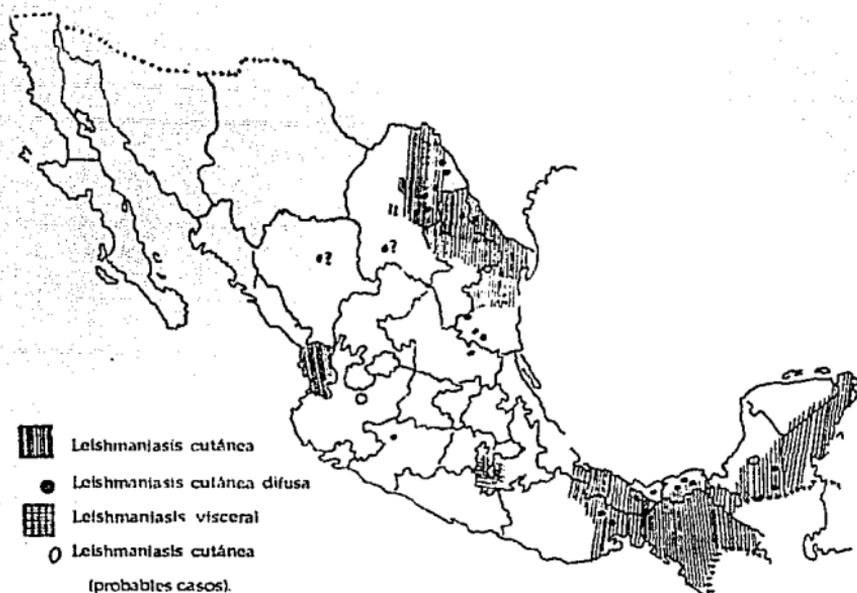
Los estudios de los parásitos provenientes de infecciones cutáneas localizadas, indican que pertenecen a la subespecie Leishmania mexicana mexicana. En cambio se desconoce si las lesiones producidas en la forma cutánea diseminada son causadas por parásitos de una nueva subespecie de L. mexicana, tal como se propuso el de Leishmania mexicana pifanoi, para el caso de la leishmaniasis difusa en Venezuela.

En México, la leishmaniasis cutánea se encuentra distribuida principalmente en la península de Yucatán y más recientemente se han reportado casos de pacientes infectados en los Estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Coahuila, Tamaulipas y Nayarit (esquema 1) (Velasco, 1987; Velasco *et al.*, 1989). En relación a la leishmaniasis visceral, también se han descrito algunos casos en la región del Río Balsas y en los Estados de Puebla, Guerrero y Morelos.

#### CICLO DE VIDA:

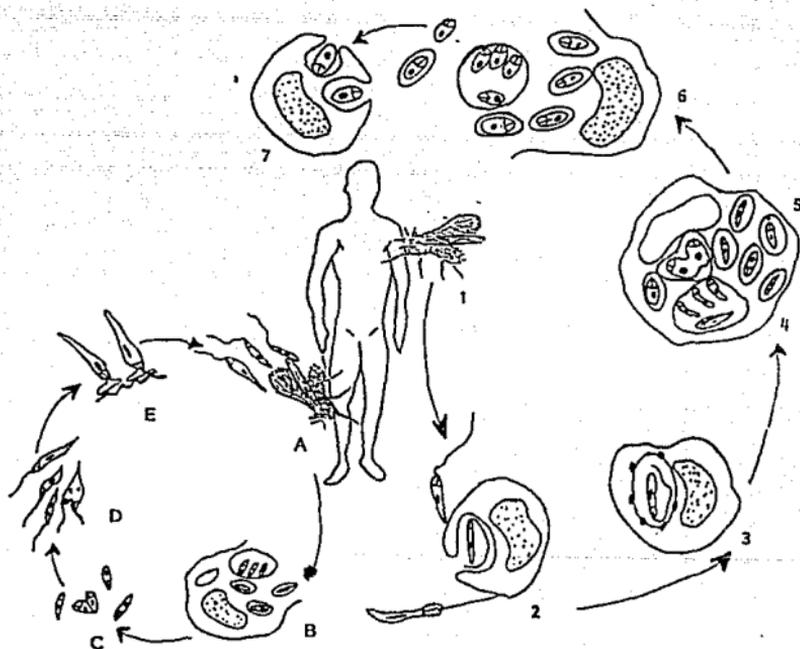
Los parásitos del género Leishmania, viven en íntimo contacto con tejidos de organismos de diferente origen filogenético (Brow y Neva, 1983; Spencer, 1973; Kreir, 1977). Durante su ciclo de vida, el parásito pasa por las fases de promastigote y amastigote morfológica y fisiológicamente distintas. Una parte de su vida la lleva a cabo en el tracto digestivo de los mosquitos del género Lutzomyia, que habitan bajo la hojarasca, miden de 2 a 3 milímetros (Mahmoud y Warren, 1977; Wilford, 1974; Laison, 1982), y se distribuyen en los trópicos y subtropicos. Las hembras, al alimentarse de la sangre de organismos infectados (Mahmon y Warren, 1977), pueden ingerir macrófagos infectados con la forma amastigote (esquema 2). Cuando pasan al intestino medio, los amastigotes son liberados por digestión de los macrófagos y se transforman a promastigotes o formas flageladas, se multiplican por

**DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS LEISHMANIASIS  
EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.**



ESQUEMA 1

**CICLO DE VIDA DE *Leishmania mexicana* EN VECTOR *Phlebotomus* Y EN EL HOSPEDERO-MAMIFERO**



**Fase de promastigote.**

- A) Ingestión de macrófagos infectados por la hembra *Phlebotomus*.
- B) Liberación del amastigote en el tracto digestivo del mosquito.
- C) Diferenciación de amastigote a promastigote.
- D) Proliferación del promastigote
- E) Adhesión al epitelio intestinal y colonización de la faringe y cavidad bucal.

**Fase de amastigote.**

- 1) Inoculación por el mosquito *Phlebotomus*
- 2) Fagocitosis por el macrófago del parásito
- 3) Formación de vacuola fagocítica
- 4) Diferenciación de promastigote a amastigote
- 5) Proliferación por fisión binaria,
- 6) Liberación del parásito.
- 7) Nuevas fagocitosis y dispersión de la *Leishmania*.

**ESQUEMA 2**

división binaria longitudinal y se mueven hacia la región posterior del intestino, en donde se adhieren al epitelio por la parte terminal del flagelo; posteriormente colonizan la faringe y la cavidad bucal (Wilford, 1974; Chang *et al.*, 1985). A partir de este momento, las hembras infectadas son capaces de inocular promastigotes a otros mamíferos. El proceso infectivo del hombre se inicia por la picadura de la hembra, que a través de su aparato bucal inocular o regurgita promastigotes en la piel. Los promastigotes al entrar en el hospedero son reconocidos como cuerpos extraños e inducen una respuesta inmune celular en la que participan principalmente macrófagos, que endocitan a los parásitos y permanecen en una vacuola denominada fagocítica o parasitófora. En el interior de la vacuola el parásito realiza los siguientes procesos: 1) La diferenciación de promastigotes a amastigotes, que involucra cambios tanto funcionales como estructurales (Chang *et al.*, 1985; Fong y Chang, 1982; Fong y Chang, 1981) y 2) la proliferación del parásito, que genera un número elevado de amastigotes (Chang *et al.*, 1985; Fong y Chang, 1982). Con la ruptura de macrófagos infectados se liberan parásitos que al ser nuevamente fagocitados por otros macrófagos, facilitan la infección de otras regiones del organismo alejadas del sitio de inoculación. De esta manera, el hombre actúa como un huésped reservorio accidental durante la vida del parásito.

#### MORFOLOGÍA Y CITOLOGÍA DE AMASTIGOTES Y PROMASTIGOTES.

El promastigote, como ya se mencionó, vive en el tracto digestivo del insecto vector (*Luizomyia*), tiene forma de huso y mide de 14-20  $\mu\text{m}$  de largo y 1.5-3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presenta un flagelo en posición anterior de aproximadamente 15-28  $\mu\text{m}$ , que le permite desplazarse de un lugar a otro. Los amastigotes se desarrollan

intracelularmente en los fagocitos mononucleares, tienen forma ovalada y con una longitud promedio de  $3 \mu\text{m}$  y  $1.5 \mu\text{m}$  de diámetro. El flagelo es muy pequeño y esta restringido a la región del saco flagelar, que constituye un compartimento intracelular donde se desarrolla el flagelo (esquema 3).

La utilización del microscopio electrónico, ha permitido observar con mayor detalle varios organelos como el núcleo, que al igual que otros eucariontes presenta una doble membrana y un sistema de poros nucleares, con un diámetro de 80 nm. La membrana nuclear, a su vez, guarda una estrecha relación con el retículo endoplásmico. Estos parásitos se distinguen de otros flagelados por presentar un organoide denominado Kinetoplasto, en cuyo interior se observa un material denso a los electrones, que corresponde al DNA superenrollado en forma de espiral. También se presenta el aparato de Golgi, el cual normalmente se localiza entre el núcleo y el Kinetoplasto, formando cisternas membranales poco aparentes. El flagelo está constituido por 9 pares de microtúbulos periféricos y dos centrales. Ambas formas del parásito presentan un sistema de microtúbulos, debajo de la membrana plasmática, el cual funciona como citoesqueleto que da forma y flexibilidad al parásito (Brow y Neva 1983; Wilford, 1974; Spencer, 1973; Manson-Bhar y Apted, 1982; Kreir, 1977; Chang *et al.*, 1985).

La ubicación taxonómica de Leishmania mexicana, según Levine *et al*; 1980 es la siguiente:

Reino: Protista Haeckel, 1986

Subreino: Protozoa Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845

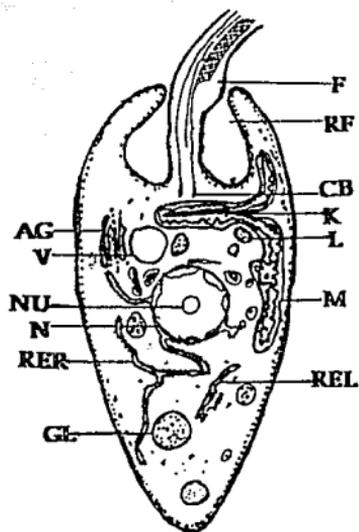
Phylum: Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963

Subphylum: Mastigophora Diesing, 1866

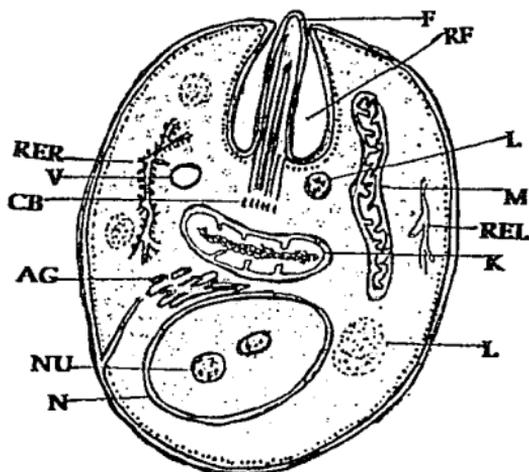
Clase: Zoomastigophorea Calkins, 1909

Orden: Kinetoplastida Honigberg, 1963

Suborden: Tripanosomatina Kent, 1880



PROMASTIGOTE.



AMASTIGOTE.

Esquema de la forma promastigote y amastigote. F=Flagelo, RF=receptorio flagelar, CB=cuerpo basal, K=kinetoplasto, L=lisosomas, M=mitochondria REL=retículo endoplásmico liso, AG=aparato de golgi, V=vacuolas, NU=nucleolo, N=núcleo, GL=gotas lipídicas. RER=retículo endoplásmico rugoso.

Familia: Trypanosomatidae Doflein, 1901

Género: Leishmania Ross, 1903

Especie: L. mexicana Biagi, 1953 enmend. Garnham, 1961

## RELACION HUESPED-PARASITO

Con la finalidad de facilitar el análisis de las interacciones que se producen entre el parásito y las células del huésped varios autores (Chang *et al.*, 1985; Chang, 1983; Blackwell y Alexander, 1983; Fong y Chang, 1982) han propuesto la existencia de varios eventos:

El reconocimiento e interacción entre el parásito y el macrófago

La endocitosis de los parásitos por los macrófagos

La diferenciación del parásito en amastigotes

La proliferación

La sobrevivencia de los parásitos

## RECONOCIMIENTO ENTRE EL PARASITO Y EL MACROFAGO.

Los promastigotes al ingresar al huésped mamífero interactúan con los componentes del sistema inmune humoral y celular. Así los macrófagos aparentemente se ven atraídos por los parásitos a través de efectos quimiotácticos (Bray, 1983). Este investigador encontró que durante la interacción entre promastigotes de Leishmania mexicana y macrófagos peritoneales de ratón en presencia de suero normal de humano, ratón y cobayo, se producía un gradiente de atracción entre los parásitos y los macrófagos de ratón y que este gradiente se veía

disminuido con suero de ratón deficiente en el citocromo C5 e inhibido por la carboxipeptidasa B (que destruye complemento). Estos resultados mostraron que existía un gradiente de atracción quimiotáctico asociado a la presencia del complemento. Posteriormente Chang y Bray, 1985 propusieron que la interacción Leishmania - macrófago podía ser suero dependiente y suero independiente. La suero dependiente está mediada por la adsorción de moléculas opsonizantes (anticuerpos y complemento) por parte de los promastigotes y su subsecuente unión a los receptores C3b o Fc de los macrófagos. La interacción suero independiente (Chang y Bray, 1985) parece ser del tipo ligando-receptor, en la que participan lectinas presentes en la superficie del macrófago y azúcares como manosa, glucosa y fucosa, presentes en la superficie de los promastigotes. Bray, 1983 sugirió la existencia de un receptor semejante a la aglutinina de germen de trigo sobre la superficie de promastigotes de Leishmania mexicana mexicana. Saraiva y Andrade, 1986 por otra parte, encontraron que los promastigotes infectivos de Leishmania mexicana amazonensis presentan azúcares en la superficie celular y una mayor unión a lectinas que reconocen azúcares del tipo D-galactosamina, y  $\alpha$ -D-manosa. Estos resultados y los reportados por Sihal et al., 1984 en los cuales se demuestra la presencia de receptores específicos para D-manosa y N-acetil D-glucosamina sobre la superficie de macrófagos han sugerido que la interacción ligando-receptor juega un papel crucial en la fagocitosis no dependiente de suero y se ha propuesto que esta interacción se lleva a cabo mediante el receptor fucosa manosa (RFM) de los macrófagos que reconoce manosa, fucosa o N-acetil-glucosamina, que se encuentran presentes en la superficie de promastigotes. Zenian, 1981 inhibió interacción de Leishmania tropica y macrófagos peritoneales de ratón utilizando fucosa y galactosa. De igual forma Chanon et al., 1984 al trabajar con Leishmania donovani y macrófagos peritoneales de ratón, logró inhibir la interacción con D-glucosa, D-fucosa, N-acetil-glucosamina y D-galactosa o al tratar previamente los

promastigotes con D-manosidasa, N-acetilglucosidasa o  $\beta$ -glucuronidasa. Todos estos hallazgos sugieren la presencia de carbohidratos en la superficie celular de Leishmania formando parte de glicoproteínas con residuos de manosa, glucosa, galactosa, fucosa o N-acetil-glucosamina. Al respecto Chang *et al.*, 1986 consideró la participación de glicoproteínas como la gp 63 con residuos de manosa y N-acetil-galactosamina, en las interacciones de promastigotes con macrófagos, ya que han visto que esta molécula purificada inhibe la adhesión entre Leishmania y los macrófagos en un 50 %, lo mismo mostró Russell, 1986 con anticuerpos monoclonales contra la gp 63.

#### ENDOCITOSIS DE LOS PARASITOS POR LOS MACROFAGOS.

Alexander y Vickerman, 1975 propusieron que la internalización de los parásitos adheridos a los macrófagos se efectuaba activamente por los fagocitos a través de la participación de microfilamentos de actina y moléculas de miosina. Esto se vio apoyado por los experimentos realizados sobre las interacciones entre L. mexicana y macrófagos peritoneales de ratón tratados con 5 a 10  $\mu\text{g/ml}$  de Citocalasina B, que interfiere con la polimerización de las moléculas de actina, y encontraron que los parásitos se unían a la superficie de los macrófagos, pero no eran endocitados. Además, Benoliel *et al.*, 1980 mostraron que los macrófagos peritoneales de rata tratados con yodoacetato (inhibidor de glicólisis) no fagocitaban a los promastigotes. Estos resultados indicaron que es necesario que los macrófagos participen activamente en la endocitosis del parásito. Por otra parte Wilson y Pearson, 1988; y Chang y Bray, 1985 propusieron que el receptor fucosa-manosa presente en macrófagos, jugaba un papel importante en la ingestión de promastigotes de L. donovani. Blackwel y Alexander, 1983 consideraron que la endocitosis de Leishmania se efectuaba por la formación de una invaginación de

la membrana plasmática de los macrófagos con lo cual el parásito quedaba incluido en una vacuola denominada parasitófora. Posteriormente, los gránulos lisosomales se unían a la vacuola parasitófora y descargaban su contenido (enzimas lisosomales). Posteriormente se inician una serie de reacciones bioquímicas que en conjunto reciben el nombre de "explosión oxidativa", en la que aumenta la producción de  $H_2O_2$  o del anión superóxido. Uno de los aspectos sobresalientes de Leishmania es su capacidad de contrarrestar los efectos del superóxido y peróxido de hidrógeno así como a las enzimas lisosomales. Al respecto Murray, 1981 reportó que los promastigotes de L. donovani pueden infectar y sobrevivir en células de la línea tumoral de ratón J774, que normalmente no tienen capacidad de producir respuesta oxidativa y que la estimulación de estas células con linfocinas momentos antes de la infección con el parásito, permitía restaurar la "explosión oxidativa", por ende producía la muerte del parásito. A esto se suman los trabajos del mismo Murray et al., 1985; Paswell et al., 1986; y Chang y Chiao, 1981 en los que se hace evidente la existencia de una relación directa entre la capacidad de las linfocinas para desencadenar la "explosión oxidativa" en macrófagos humanos, peritoneales de ratón y la actividad leishmanicida. Complementando estos hallazgos, Buchmüller y Maüel, 1986 encontraron que los macrófagos de ratón resistentes a la infección con L. major o L. enrietti, produce mayores cantidades de  $O_2$  y  $H_2O_2$ , que los macrófagos de ratones sensibles de la cepa CBA/2 y BALB/c. Estos hallazgos sugieren que los parásitos posiblemente presentan algún mecanismo de degradación de esos metabolitos tóxicos, permitiéndoles sobrevivir en el interior de los macrófagos.

#### LA DIFERENCIACION DEL PARASITO EN AMASTIGOTES.

La diferenciación del parásito de la forma promastigote a la de amastigote es un evento importante en el establecimiento y transmisión de la enfermedad. La

diferenciación se ha estudiado básicamente a nivel morfológico y molecular (Chang, 1983) implicándose en este evento al microambiente lisosomal y a la temperatura como uno de los posibles inductores de este proceso. Fong y Chang, 1981, mostraron que había cambios en ciertas proteínas de los promastigotes al transformarse en amastigotes, así por ejemplo, observaron que había una disminución en el contenido de tubulina, que correlacionaba con la presencia de microtubulos submembranales en los parásitos. También se han detectado cambios en seis proteínas específicas de promastigotes y tres de amastigotes. El uso de anticuerpos monoclonales ha permitido distinguir proteínas de membrana específicas de promastigotes que no reaccionan con amastigotes. Hernández, 1980; Ayesta *et al.*, 1985; Fong, 1982; y Sacks *et al.*, 1987, también han mostrado diferenciación en el contenido de carbohidratos de la superficie celular entre amastigotes y en promastigotes.

#### LA PROLIFERACION.

La proliferación de Leishmania en el interior de la vacuola parasitófora es otro de los eventos importantes que ocurren durante el establecimiento de la enfermedad. Poco se conoce acerca de los factores que participan en este proceso, aunque hay indicaciones de ciertos requerimientos nutricionales específicos y de la temperatura. Así por ejemplo, la temperatura de 34-37 °C favorece el crecimiento de L. mexicana (Alexander y Vickerman, 1975; Handman y Spira, 1977; Chang, 1983).

## LA SOBREVIVENCIA DE LOS PARASITOS.

Para explicar la sobrevivencia de Leishmania en fagocitos mononucleares se ha propuesto fundamentalmente que los parásitos producen glicoconjugados que les confieren protección. Entre las hipótesis que se han postulado, se propone que los parásitos liberan metabolitos denominados factores de secreción, los cuales inhiben directamente a ciertas enzimas lisosomales del macrófago (Alexander y Vickerman, 1975; El-On et al., 1980; Rodríguez et al., 1983). En cambio otros sugieren (Chang y Dwyer, 1976; Chang, 1983; Chang y Bray, 1985) que la sobrevivencia del parásito es debida a la resistencia de las glicoproteínas de la superficie de Leishmania a enzimas lisosomales y también a superóxidos. Uno de los factores de secreción que se han caracterizado corresponde a un lipofosfoglicano (LPG) que en su forma membranal esta constituido por carbohidratos, lipopeptidos, ésteres de fosfato y esfingosina (Wright y Eulamin, 1989). Anteriormente El-On y Shnur, 1974 indicaron que este factor en su forma soluble presenta carbohidratos de un peso molecular de 33 000 daltones con la capacidad de precipitar anticuerpos aún después de someterlos a ebullición o ser tratados con tripsina, pronasa, neuraminidasa o hialuronidasa. Slutzky y Grenblatt, 1977 mostraron que el factor de secreción de Leishmania tropica contiene glucosa, galactosa manosa y residuos de glucosamina y que presenta afinidad a la lectina de cacahuate la cual es específica para residuos de galactosa. En la copa NR de L. braziliensis, se encontró que los productos solubles secretados contienen 6 glicoproteínas, las cuales estan asociadas a la membrana plasmática del parásito y son reconocidas por cancanavalina A. El efecto de los factores de secreción en la inhibición lisosomal se basa en observaciones hechas por El-On et al., 1980; y Sacks y da Silva, 1987, indican que el LPG sufre modificaciones durante el desarrollo del parásito. El cambio consiste en la adquisición de nuevos carbohidratos que aparentemente protegen más eficientemente al parásito contra

los agentes destructivos del macrófago, inhibiendo por ejemplo enzimas hidrolíticas como la  $\beta$ -galactosidasa hasta en un 72 %. Recientemente Turco, 1988 ha sugerido que este glicoconjugado, inhibe a la proteína cinasa C, la cual es responsable de activar la respuesta oxidativa de los macrófagos.

El LPG es además altamente inmunogénico ya que induce la formación de una gran cantidad de anticuerpos. La inmunización de ratones con LPG produce una protección adecuada contra infecciones experimentales.

La hipótesis de que la Leishmania tiene moléculas en la membrana plasmática que le confieren resistencia a la degradación por enzimas lisosomales se basa en la observación de que otros microorganismos fagocitados conjuntamente con el parásito eran lisados en tanto que las Leishmanias sobrevivían Chang y Dwyer, 1976. Posteriormente Chang, 1983 encontró que las glicoproteínas de 68 y 43 kDa, de la superficie celular de promastigotes marcadas con iodo radiactivo y metionina y separadas en columnas de Con-A-Sepharosa no eran degradadas por las enzimas lisosomales de hígado de rata, aun cuando se incubaron por largos períodos. De igual manera, cuando los promastigotes vivos marcados con iodo radiactivo se pusieron a interaccionar con macrófagos peritoneales de ratón, conservaban las moléculas de la superficie celular sin que fueran degradadas. Estos resultados proporcionan evidencias directas de la resistencia de las glicoproteínas membranales a la degradación por enzimas lisosomales, posiblemente confiriéndole de esta manera protección al parásito. Otra glicoproteína que se ha probado es la denominada gp 63, de la cual Bordier, 1987 considera que existen 500 000 copias expuestas en la superficie de los promastigotes. Esta glicoproteína presenta actividad de proteasa, ya que en estudios realizados por Etges *et al.*, 1986; y Bordier, 1987 observaron en forma casual, que proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular en geles de poliacrilamida desaparecían cuando se mezclaban con la gp63 y que la actividad de esta proteasa estaba presente en el

parásito vivo y en la molécula aislada. La presencia de la glicoproteína fosfatasa ácida la cual en la membrana de promastigotes de Leishmania (Gottlieb y Dwyer, 1981), también parece participar en la adaptación del parásito para vivir en un microambiente hidrolítico como lo proponen Ramaley *et al.*, 1984 al determinar que la fosfatasa ácida aislada de la membrana plasmática de promastigotes de L. donovani inhibía en un 90% la generación de superóxido; y este efecto no se observa con la fosfatasa alcalina de Escherichia coli, lo que nos indica que el efecto de la fosfatasa ácida de Leishmania es específico (Katakura y Kobayashi, 1988); Esta glicoproteína, además es más resistente a la desnaturalización por el superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso en comparación con otras fosfatasas ácidas de plantas y de animales.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS:

La superficie celular de los organismos eucariontes esta constituida por una bicapa de lípidos a la que se asocian proteínas y glicoproteínas de la membrana celular. Algunas proteínas integrales se orientan hacia el citoplasma y las glicoproteínas ricas en carbohidratos se exponen al medio extracelular. Así la superficie celular está constituida principalmente por glicoproteínas y en menor proporción por glicolípidos.

La superficie celular del parásito *Leishmania*, presenta glicoproteínas con residuos de  $\alpha$ -D-manosa/glucosa, D-galactosa, N-acetil-galactosamina, N-acetilglucosamina, y  $\alpha$ -L-fucosa (Dwyer y Gottlieb, 1985) que participan fundamentalmente en las interacciones de reconocimiento entre los macrófagos y el parásito, la endocitosis y la sobrevivencia (Zenian, 1981; Chang, 1981; y Chang y Bray, 1985). La presencia de algunas glicoproteínas como por ejemplo los que presentan manosa en la membrana de los parásitos determina así mismo el grado de virulencia de ciertas cepas de *L. braziliensis* (Hernandez, 1982; Ayesta et al., 1985). Uno de los procedimientos para determinar la presencia de carbohidratos sobre la superficie de promastigotes de *Leishmania* ha sido el uso de lectinas debido a su alta afinidad por residuos específicos de azúcares. Por ejemplo, la concanavalina A se une a residuos  $\alpha$ -metil-D manosido, mientras que la aglutinina de germen de trigo se une a los residuos de N-acetilglucosamina. El uso de lectinas en parasitología ha sido de gran utilidad para distinguir entre formas virulentas y no virulentas y en la clasificación de las Leishmanias. Varios autores han determinado el patrón de glicoproteínas de *L. donovani* (Dwyer y Gottlieb, 1985) *L. tropica* y *L. mexicana* encontrandose al rededor de 40 proteínas de membrana que van de de 12 a 220 kDa. Por el método de radioiodinación con lactoperoxidasa se encontró que 23 proteínas de membrana fueron glicoproteínas con residuos de manosa. Lepay et

al. 1983 mostró la existencia de aproximadamente 20 glicoproteínas de superficie. Gardiner y Dwyer. 1983, también reconocieron 20 glicoproteínas en *L. tropica* con pesos moleculares que van de 10 a 110 kDa.

En contraste con lo expuesto anteriormente, de las cepas de *Leishmania mexicana* aisladas en nuestro país se desconoce cuáles son los componentes más importantes que le confieren sus características clínicas específicas. De igual manera no se sabe si los parásitos que producen leishmaniasis cutánea diseminada son iguales que aquellos que producen leishmaniasis cutánea localizada. El propósito de este estudio es caracterizar una cepa de *Leishmania* proveniente de un paciente que tenía leishmaniasis difusa, utilizando lectinas específicas que reaccionan con glicoproteínas de la membrana plasmática.

Para desarrollar este objetivo, en primera instancia se verificó la existencia de glicoconjugados en parásitos completos de la forma promastigote utilizando varias lectinas. Específicamente se trató de definir si existen glicoproteínas ricas en los residuos a-D-manosa, a-D-glucosa, con la utilización de Concanavalina A conjugada con isotiocianato de fluoresceína para detectarlas con el microscopio de fluorescencia.

Posteriormente se obtuvieron las proteínas totales de los promastigote y después de que fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida se trató de identificar las glicoproteínas con residuos manosa ó glucosa, presentes en el parásito, utilizando a la concanavalina A-peroxidasa-DAB, e igualmente se hizo la identificación por inmunotransferencia en papel de nitrocelulosa, pero utilizando en los controles peroxidasa-DAB y DAB sola o bien la Con A con su azúcar competidor; además los parásitos completos se incubaron con DAB.

## MATERIALES Y METODOS.

### CULTIVO DE PROMASTIGOTES DE Leishmania mexicana:

El organismo utilizado en este estudio es el protozoo parásito Leishmania mexicana, el cual fue aislado del Sr. Heriberto Frias del Sureste de México, éste paciente presentaba Leishmaniasis cutánea difusa y desde su aislamiento los parásitos se mantienen mediante dos sistemas: in vivo, por inoculaciones sucesivas en hamsters dorados (Cricetus auratus) e in vitro (los usados en este trabajo) se cultivaron axénicamente en medio mínimo esencial (MEM, Gibco), el cual contenía 0.435 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en polvo, y 0.07 g de fosfato de potasio monobásico a un pH de 7.2 suplementado con Suero Fetal de bovino inactivado 10% (Gibco) y Penicilina-Estreptomicina 1%. El medio se esterilizó por filtro millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro, se inocularon  $1 \times 10^6$  parásitos en 10 ml de medio. La resiembra se hizo en una campana de flujo laminar.

Los parásitos se cultivaron en matraces estériles de 25 ml o bien en cajas de cultivo estériles de 20 ml (Nunc), la cepa se mantuvo a 28 °C, alcanzando a los 8 días aproximadamente la fase estacionaria de crecimiento que es la más infectiva, por lo que esta etapa fue la que se tomó para todos los experimentos.

### MARCAJE DE LA SUPERFICIE CELULAR DE LOS PROMASTIGOTES CON Con A - FITC.

Los promastigotes cultivados en MEM, se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4. En el último lavado los promastigotes se resuspendieron en un volumen conocido de PBS para contar el número de células en una cámara de Neubauer. Se colocaron un

millón de parásitos en dos tubos eppendorf y se centrifugaron nuevamente. Los parásitos se resuspendieron en una solución de PBS con 100  $\mu\text{g/ml}$  de Concanavalina A conjugada con FITC (Con A-FITC). Además, a uno de los tubos se le adicionó  $\alpha$ -metilmanosido (0.2 M) y se incubaron por 30 min a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 y se observaron con un microscópio American Optical equipado con un sistema de epifluorescencia.

#### LOCALIZACION DE GLICOPROTEINAS DE LA SUPERFICIE CELULAR DE LOS PROMASTIGOTES: REACCION CON ConA-Peroxidasa.

Para realizar la localización de las glicoproteínas de Leishmania mexicana se emplearon las metodologías de Bernhard y Avrameas, 1970 y Ayesta *et al.*, 1985. Los promastigotes se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 frío y se fijaron con glutaraldehído 2% en PBS, durante una hora, ya fijados se lavaron nuevamente 3 veces con PBS, para eliminar el exceso de fijador, después se incubaron con la Con A [100 $\mu\text{g/ml}$  en PBS] durante 30 minutos a temperatura ambiente, terminado el tiempo de incubación se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4. Los parásitos se incubaron con peroxidasa [100  $\mu\text{g/ml}$  en PBS] durante 30 minutos, se lavaron nuevamente y se incubaron con diaminobenzidina [0.5 mg/ml en tris 0.1M, pH 7.4] y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.01% durante 15 minutos, se lavaron nuevamente 3 veces en PBS, se fijaron con tetroxido de osmio al 1%, se deshidrataron y se continúa la técnica de incluir en Epón.

## CONTROL DEL MARCAJE DE SUPERFICIE DE Leishmania SIN LA LECTINA.

Los Promastigotes de Leishmania mexicana se cosecharon y se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 a 4 °C y se fijaron con glutaraldehído al 2 % en PBS durante una hora; ya fijados se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con la Peroxidasa (10 µg/ml en PBS) 15 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación los parásitos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con 3' Diaminobenzidina 0.5 mg/ml en tris 0.1 M pH 7.4 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.01% final, durante 15 minutos, terminada la reacción se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% en cacodilato 0.1 M, durante una hora a temperatura ambiente, se deshidrataron y posteriormente se incluyeron en Epón (ver apéndice), para ser observados posteriormente al microscópio electrónico.

## CONTROL CON DAB SIN LA LECTINA EN PROMASTIGOTES DE Leishmania mexicana. E IDENTIFICACION DE CITOCROMO OXIDASA.

Los parásitos en fase estacionaria de crecimiento y cultivados en MEM, se lavaron 3 veces con amortiguador de fosfatos (PBS) a 4 °C pH 7.4 y se fijaron con glutaraldehído 2% en PBS, durante una hora; una vez fijados se siguieron 2 procedimientos; en un caso los parásitos se incubaron una hora a 30 °C con DAB 7.5 mM, DMSO 6%, Hepes 0.1 M pH 8.0 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15% final y en el otro caso que correspondería al control, se incubaron una hora los parásitos a 30 °C con DAB 7.5 mM, DMSO 6%, Hepes 0.1 M pH 8.0 y KCN 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15% final (Seligman *et al.*, 1968; Anderson *et al.*, 1975 y Angermüller y Fahimi, 1981). Posteriormente las dos muestras se lavaron 3 veces con amortiguador de Hepes pH 8.0 0.1 M, se posfijaron una hora a temperatura ambiente con OsO<sub>4</sub> 1%, en

cacodilato 0.1 M pH 7.2, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90%, absoluto) y se continuó con la metodología de inclusión en Epón.

#### OBTENCION DE PROTEINAS DE Leishmania mexicana.

Para estudiar las glicoproteínas de Leishmania mexicana se obtuvieron las proteínas del parásito y se analizaron por PAGE-SDS de la siguiente forma:

Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS frío pH 7.4 a 2500 rpm. durante 10 min. En el último lavado, la pastilla se resuspendió en un volumen conocido de PBS para contar el número de parásitos y 0.1 ml de las células se fijaron en glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído 2% en cacodilato 0.2 M y cloruro de calcio 2.5%, durante 10 minutos y se contó el número de células, paralelamente la pastilla resuspendida se centrifugó nuevamente, eliminando algo del sobrenadante y las células se resuspendieron y se pasaron a tubos eppendorff, en donde se centrifugaron un minuto a 1500 rpm. Una vez obtenida la pastilla, se eliminó la mayor parte de sobrenadante y se le adicionaron inhibidores de proteasas. Para encontrar el inhibidor apropiado se probaron el n-etilmaleimida (NEM), para hidroximercuri benzoato (PHMB) y el fenil-metil sulfonyl fluoruro (PMSF). También se probaron diferentes métodos de extracción de proteínas para ver cual de las metodologías era la apropiada para evidenciar el mayor número de proteínas posibles del parásito Leishmania. Las metodologías utilizadas fueron la extracción cetónica, en la cual se puso una relación de 4 volúmenes de acetona fría por 1 del extracto de los parásitos con ó sin Zwittergen. Otra fue la de condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol ó sin él), dentro de las cuales se probaron modificaciones como hervir la muestra después de incubar 10 min con los inhibidores, o hervir inmediatamente. El PHMB a una concentración 100 mM, se resuspendió perfectamente con los parásitos lavados previamente con PBS PH 7.4 y

posteriormente se daban de 5 a 6 ciclos de congelación-descongelación, verificando en el microscopio que las células estuvieran lisadas. Posteriormente a los parásitos lisados se le agregaron 50  $\mu$ l de amortiguador de muestra 2x (trizma-base 1.51 g, SDS 2.0 g, glicerol 25.0 g, pironina ó azul de bromofenol 0.002 g y H<sub>2</sub>O bidestilada cbp 100 ml pH 6.8) y se hirvieron inmediatamente durante 5 min, después se centrifugó un minuto y se tomó una muestra para determinar contenido de proteínas, utilizando el método de Lowry, 1951 (2  $\mu$ l y 5  $\mu$ l). Y al lisado de proteínas de Leishmania, se le adicionó  $\beta$ -mercaptoetanol, a una concentración final de 5% y se hirvió un minuto, estando de esta manera las proteínas de Leishmania listas para su separación por electroforesis.

#### ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS).

Para preparar el gel de poliacrilamida utilizamos: el método de Laemmli, 1970 Acrilamida (Bio-Rad) al 30% , N, N' Metilen bis-acrilamida (Bio-Rad) al 0.8%, Metiltilenediamina (TEMED Bio-Rad) y persulfato de amonio (Bio-Rad) 12.5%.

La electroforesis se llevo a cabo en una mini cámara de electroforesis (Idea Scientific mini-Slab), y el gel separador que se utilizó en todos los experimentos fue al 10%. La mezcla para preparar el gel consistió en (ver apendice) 2.335 ml de la solución A; 1.316 ml de B; 0.070 ml de D; 0.699 ml de Glicerol (50%); 2.533 ml de agua desionizada; 0.036 ml de solución E; y 0.010 ml de TEMED.

El gel concentrador se hizo al 5% que consta de 0.345 ml de solución A; 0.435 ml de solución C; 0.0207 ml de solución D; 1.175 ml de agua desionizada; 0.0207 ml de E y 0.003 ml de TEMED. El amortiguador de corrida consta de Glicina 14.41 g; Tris-base 3.02 g; SDS 1.0 g, disuelto en agua cbp en 1000 ml pH 8.3. En cada pozo se colocaron 70  $\mu$ g de proteína de Leishmania, y 2  $\mu$ g de marcadores de

pésomolecular (Bio-Rad). Se sometieron a un voltaje constante (50 volts), hasta que la muestra paso por el gel concentrador, en ese momento el voltaje se aumentó a 100 volts.

El gel se puso a tñó con azul de Coomassie (Bio-Rad) 1% en metanol 50% y Acido acético 10% y se dejo en agitación durante hora y media, posteriormente el gel se destñó con una solución de metanol al 50%, acido acético 10% y agua.

#### TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA (PNC).

Para efectuar la transferencia de las proteínas a Papel de Nitrocelulosa (PNC - Hoefer Scientific Instruments 0.45  $\mu\text{m}$  de diametro de poro) se utilizó la camara de transferencia (Idea Scientific mini-slab). La transferencia se llevó a cabo a 12 volts y 500 mAmperes durante una hora. Terminada la transferencia, el PNC se incubó en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) 3%, gelatina 0.1% azida de sodio 0.1% en PBS pH 7.4 toda la noche a 4°C y agitación constante, para bloquear la unión inespecífica de proteínas. Bajo estas condiciones el PNC se puede guardar a 4°C ó bien se puede utilizar inmediatamente después de un lavado con PBS-Tween ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM y NaCl 150 mM y Tween al 0.05%).

#### DETECCION DE GLICOPROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Los experimentos para el reconocimiento de glicoproteínas mediante el uso de la ConA se llevaron a cabo siguiendo la metodología reportada por Parish *et al.*, 1977, para *Dictyostelium discoideum*. Para realizar la detección de glicoproteínas de *Leishmania mexicana* en geles de poliacrilamida, se usaron 3 variantes, para descartar artefactos de la reacción:

- a) Incubación del gel de poliacrilamida con Concanavalina A- Peroxidasa

- Diaminobenzidina (DAB) - Peróxido de hidrógeno.
- b) Incubación del gel con Peroxidasa - DAB -Peroxido de hidrógeno.
- c) Incubación del gel de poliacrilamida con DAB y Peróxido de hidrógeno.

En la primera variante de Concanavalina A - peroxidasa - DAB-peroxido de hidrógeno se realizó lo siguiente:

Terminada la electroforesis el gel se dejó lavando durante 20 horas a temperatura ambiente en agitación en una solución de isopropanol 25%, ácido acético 10% y agua 65%.

Terminado este lavado se le dió otro lavado de 2 horas en amortiguador de Fosfatos (0.169 g de  $H_2PO_4$  y 0.2069 g de  $H_2PO_4/100$  ml) 15 mM pH 6.7. El gel se incubó 2 horas con ConA [0.5 mg/ml], en amortiguador de fosfatos 15 mM. y despues de la incubación se lavó 1 hora en amortiguador de fosfatos 15 mM y otra hora en Tris-HCl 0.1 M pH 7.4. Concluido el lavado el gel se incubó 2 hrs con Peroxidasa (horseradish, laboratorios Miles) [0.1 mg/ml] en tris 0.1 M pH 7.4. y se lavó una hora con Tris 0.1 M pH 7.4 (varios cambios) y se incubó con Diaminobenzidina (Baker) [0.005g] en 10 ml de Tris pH 7.4 y 4  $\mu$ l de peroxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30%, y cuando aparecieron las bandas, la reacción se detuvo agregando agua destilada.

En la segunda variante de peroxidasa - DAB se siguen todos los pasos anteriores excepto que no se incuba con ConA.

En la tercera variante con DAB es igual que en a) pero con la diferencia de que aquí no se incuba ni con ConA, ni con Peroxidasa. Una vez que se terminaron todas las reacciones, el gel se secó y se determinaron los pesos moleculares de cada proteína revelada en el gel.

PARA LA DETECCIÓN DE GLICOPROTEINAS EN PAPEL DE NITROCELULOSA SE REALIZARON 3 VARIANTES DEL MISMO EXPERIMENTO.

1) Tiras de PNC con proteínas transferidas de *Leishmania mexicana* y bloqueadas con BSA 3%, Gelatina 0.1% en PBS se lavaron 2 veces con PBS-Tween 0.05% y se pusieron a incubar con la lectina ConA [100 µg/ml] durante toda la noche, a 4 °C y agitación constante. Al día siguiente, el PNC se lavó 1 vez con PBS-Tween 0.05%; 2 veces con PBS-Nonidet P-40 (PBS pH 7.4 y Nonidet P-40 1%) y una vez con PBS-Tween 0.05%; después se puso a incubar con peroxidasa [100µg/ml] 6 horas, a temperatura ambiente y agitación constante en oscuridad. Terminado el tiempo de incubación, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05% pH 7.4 y se puso a incubar con 3' 3' Diaminobenzidina [0.5 mg/ml] en tris-HCl [0.1M] pH 7.2 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final de 0.01%; cuando aparecieron las bandas de las proteínas la reacción de revelado se detuvo con agua bidestilada.

2) Una variante de este experimento fue utilizar a la lectina acoplada a la peroxidasa (100 µg/ml siguiendo el mismo protocolo), pero en lugar de utilizar la Diaminobenzidina, para revelar los sitios de unión de la conA-peroxidasa, se utilizó al 4 Cl-Naftol [0.5 mg/ml] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05% en PBS pH 7.4. La reacción se detuvo con agua bidestilada cuando aparecieron las bandas.

Este ensayo se realizó igual que el de ConA, con la variante de incubar 15 minutos antes la lectina con el azúcar competidor α-metilmanopiranososa a una concentración final de 0.2 M. y después se le adiciono a las tiras de PNC.

3) Se siguió la misma metodología descrita en el experimento 1 excepto que aquí no se incubó el PNC con la ConA. El PNC se incubó con la peroxidasa y la 3' 3' diaminobenzidina.

## RESULTADOS.

### LOCALIZACION DE RECEPTORES DE MEMBRANA CON CON A.

Los experimentos de marcaje de los promastigotes con Con A-FITC mostraron que los parásitos emitían una fluorescencia homogénea sobre la superficie celular incluyendo el flagelo y el saco flagelar. La especificidad de esta reacción se mostró inhibiendo la unión de la lectina al receptor de membrana haciendo la incubación de los parásitos en presencia de  $\alpha$ -D manosa. Para evidenciar la existencia de receptores de la membrana plasmática a Con A se observaron los parásitos con el microscopio electrónico de transmisión y se encontró que en efecto los receptores a la lectina marcada con peroxidasa, se encontraban distribuidos homogéneamente sobre la superficie celular de los promastigotes, incluyendo el flagelo y el saco flagelar (Fig. 1).

### PROTEINAS TOTALES DE PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*.

De los diferentes ensayos efectuados para determinar las condiciones óptimas de separación de proteínas, encontramos que la congelación y descongelación de los parásitos en presencia de 100 mM de PHMB fue la que nos permitió obtener el mayor número de proteínas y con menor degradación. El patrón de proteínas totales de promastigotes obtenidas por electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecilsulfato de sodio, mostró la existencia de 55 bandas de proteínas (Fig.2), con pesos moleculares en el rango de 13-122 kDa. Los pesos moleculares de las proteínas que mas destacan son: 14,15,18,19,25,27,31, un doblete de 35 kDa, otras de mayor peso molecular corresponden a 37, 43,47,53,62,83 kDa. De estas últimas, la que se presenta en mayor abundancia es una molécula de 53 kDa y que

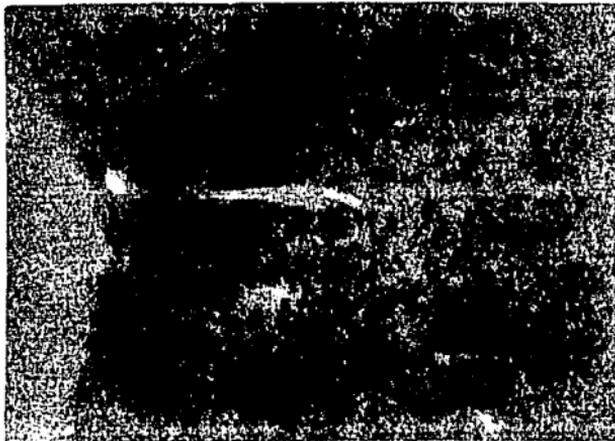


FIGURA 1.

Marcaje con Concanavalina A y fluorescencia de la superficie celular, del flagelo y saco flagelar de promastigotes de Leishmania mexicana.

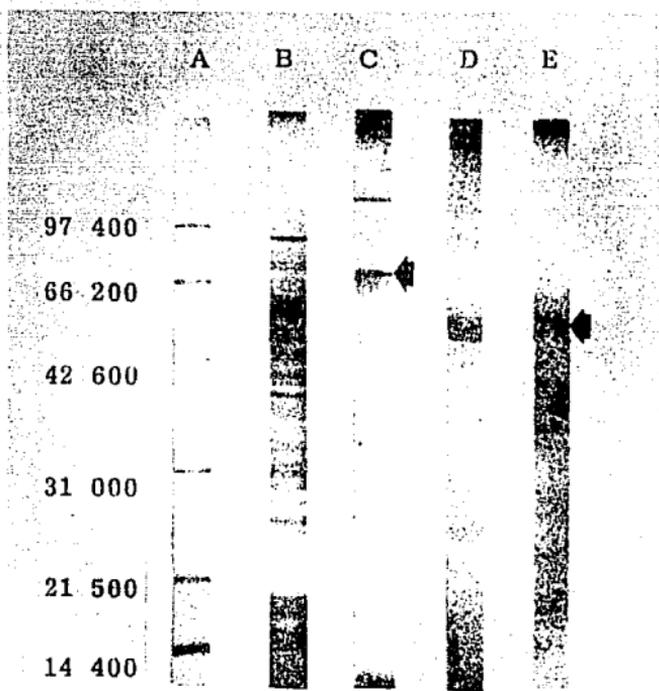


FIGURA 2.

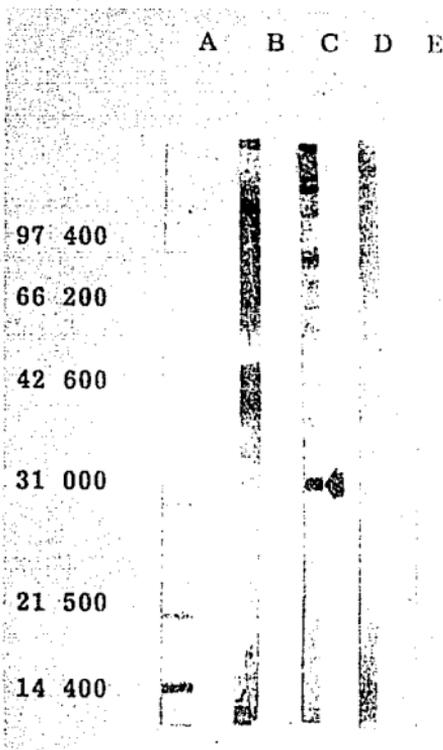
Imágen electroforética en gel de poliacrilamida-SDS al 10% de proteínas totales de Leishmania mexicana. B) Tinción con azul de Coomassie. C) Proteínas tratadas con Concanavalina A. D) Control sin lectina, con Peróxidasa-DAB. E) Control con DAB. A) Marcadores de Peso Molecular.

esta próxima a la tubulina , que tiene un peso molecular de 55 kDa (Chang *et al.*, 1985).

#### GLICOPROTEINAS DE PROMASTIGOTES DE Leishmania mexicana.

Una vez obtenido el patrón de proteínas totales del parásito (Fig 2, 3 y 4B), se procedió a determinar cuáles eran las glicoproteínas que presentaban afinidad por la Con A utilizando dos procedimientos diferentes. El primero, consistió en incubar directamente los geles de poliacrilamida, que contenían el extracto total de proteínas fraccionadas, con Con A-peroxidasa, y el segundo, se hizo con proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa. En los geles de poliacrilamida se encontró que varias moléculas reaccionaron con la lectina, en especial las de 36, 38, 53, 70 y 97 kDa (Fig. 2 C). Para definir la especificidad de esta reacción, se incluyeron dos controles. Uno consistió en incubar el gel de acrilamida en ausencia de Con A (Fig. 2D) y, el otro, solo con diaminobenzidina (Fig. 2E). En el primer caso, se encontró que la molécula de 53 kDa daba reacción positiva, lo mismo que una de 25 kDa, pero con menor intensidad. En el último caso, (con DAB) sólo la molécula de 53 kDa dió una reacción clara.

La identificación de las glicoproteínas utilizando el extracto total de proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa fue mas claro y permitió revelar otros componentes que no se detectaron en los geles de poliacrilamida. Las moléculas que se marcaron mas intensamente fueron las de 36, 99, 122, 118 kDa (Fig. 3C). Los mismos controles que se utilizaron para las reacciones en los geles de poliacrilamida, se hicieron con los papeles de nitrocelulosa, pero en este caso, no se detectaron moléculas que dieran reacción inespecífica en ausencia de la lectina (Fig.3D). Otro control que se utilizó en el PNC fué la inhibición de la lectina con el azúcar  $\alpha$ -metil-manosido (Fig. 4E).



**FIGURA 3.**

Imagen de la inmunotransferencia de proteínas totales de Leishmania mexicana. B) Proteínas detectadas por Concanavalina A, reveladas con DAB, C) Proteínas detectadas por Concanavalina A, reveladas con 4-Cloro-Naftol. D) Control sin lectina. E) Control con lectina y  $\alpha$ -metilmanósido. A) Marcadores de peso molecular.

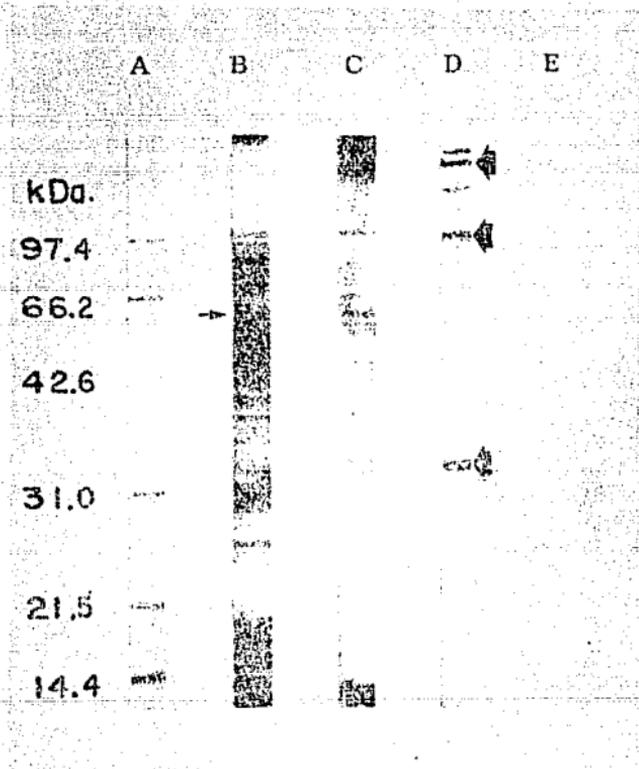


FIGURA 4.

Imagen de proteínas totales de Leishmania mexicana. B) Tinción con azul de Coomassie. C) identificadas por Concanavalina A en gel de poliacrilamida. D) identificadas por Concanavalina A en PNC. E) Control con la lectina y  $\alpha$ -me tilmanósido. A) marcadores de peso molecular.

## IDENTIFICACION DE LA ESTRUCTURA CELULAR QUE PRESENTA REACCION DE PEROXIDASA ENDOGENA.

Motivados por los resultados obtenidos de la reacción de los geles de poliacrilamida con la diaminobenzidina, nos propusimos definir cual era la estructura celular que presentaba esa actividad enzimática. Para ello se procesaron los promastigotes siguiendo un protocolo similar al utilizado en los geles, pero con los parásitos fijados previamente con glutaraldehído, para preservar su estructura. Bajo estas condiciones se observó que la única estructura celular que dió una reacción positiva fue la membrana interna de la mitocondria incluyendo sus crestas (Fig. 5). Como una de las moléculas de la mitocondria que podría estar involucrada en esta reacción es la citocromo oxidasa, se hicieron experimentos de inhibición de la enzima con KCN. En estas condiciones se encontró que los parásitos no se marcaban en ninguna de sus componentes celulares, sugiriendo que la citocromo oxidasa fuera la responsable de la reacción con la diaminobenzidina.



FIGURA 5.

Promastigotes de Leishmania mexicana tratados con DAB.  
A. Micrografía que muestra la reacción de la peroxidasa endógena en la membrana interna mitocondrial y sus crestas.  
B. Amplificación en la que se observan las crestas de la mitocondria (flecha).

## DISCUSION:

Como se sabe la membrana plasmática de los parásitos es de gran interés debido a la adaptación que debe presentar en los microambientes en los cuales se desarrolla, como Leishmania, la cual vive en el microambiente del tracto digestivo del insecto vector y después en las vacuolas parasitoforas del macrófago (hospedero vertebrado). Esta alternancia en el ciclo de vida de Leishmania ha llamado la atención a diferentes investigadores, los cuales han propuesto (basándose en diferentes evidencias) que la membrana plasmática, es la que le confiere tal resistencia al parásito, permitiéndole de esta manera sobrevivir. Estos investigadores han encontrado que las proteínas membranales de mayor importancia en la vida del parásito son glicoproteínas a las cuales se les ha dado un papel preferencial en la adhesión, reconocimiento, endocitosis y en secuestrar a los promastigotes infectivos dentro de los lisosomas y fagocitos mononucleares y en la sobrevivencia (resistencia a enzimas lisosomales, y al peróxido de hidrógeno), dando como consecuencia que estas glicoproteínas intervengan en la protección contra la degradación por enzimas digestivas del hospedero. Estas glicoproteínas en Leishmania se han evidenciado en parásitos completos utilizando diferentes lectinas, dandonos información acerca de la localización y distribución de los azúcares sobre la superficie celular. Además, en membranas plasmáticas de Leishmanias, aisladas por electroforesis, utilizando técnicas de tinción como la de Shiff o la de marcaje radiactivo o la de lactoperoxidasa, se ha mostrado el tipo de glicoproteínas membranales que presenta cada especie del parásito, la abundancia y su peso molecular. Las técnicas como el marcaje radiactivo o el de lactoperoxidasa apoyados con los geles de poliacrilamida han proporcionado información mas precisa sobre la abundancia de estas glicoproteínas en la membrana del parásito. Sin embargo aún con estas técnicas, las proteínas detectadas por diferentes

investigadores en geles de poliacrilamida difiere enormemente en peso molecular y abundancia, aún utilizando las mismas metodologías. Por lo que debido a las discrepancias existentes en los reportes de las glicoproteínas membranales de las diferentes especies de éste parásito y sabiendo que contamos con una Leishmania mexicana, que no presenta una lesión cutánea común sino una difusa (reportada para la subespecie pifanoi), nosotros nos propusimos como OBJETIVO GENERAL caracterizar la cepa de promastigotes de Leishmania mexicana. Para realizar ésta caracterización, en el laboratorio se utilizaron 8 lectinas (PNA, RCA, Con A, BSI, WGA, DBA, PVA y UEA); encontrándose que los receptores a Con A son los únicos que se detectan sobre la superficie celular de los promastigotes de Leishmania mexicana.

El microscopio de fluorescencia permitió observar en toda la superficie celular, flagelo y saco flagelar de Leishmania mexicana, la abundante distribución de azúcares del tipo manosa identificadas por Con A. Esta evidencia nos dio pauta para tratar de correlacionar los estudios de parásitos completos por microscopía, con lo de las proteínas totales del parásito fraccionadas en geles de poliacrilamida. Este tipo de evidencias en el inicio de la investigación acerca del parásito son de suma importancia, ya que nos permitirá tener un panorama más completo sobre la variación que se pudiera encontrar posteriormente al aislar solo membranas del parásito. Jaffe y McMahon-Pratt, 1988, han encontrado que estas variaciones existen en los parásitos completos (a la respuesta de aglutinación) y en las transferencias de proteínas membranales a el mismo tipo de lectina, Pero no reportan lo que pasa con las glicoproteínas totales del parásito fraccionadas.

## GLICOPROTEINAS AFINES A CON-A EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Para la identificación de glicoproteínas con residuos manosa/glucosa de *L. mexicana*, se utilizó la lectina Concanavalina A para identificar proteínas separadas en geles de poliacrilamida. En este experimento encontramos que aproximadamente 20 glicoproteínas se unieron a ConA siendo las más evidentes las glicoproteínas de 97 y 36 kDa. Gardiner y Dwyer, 1983; Chang, (1983 y Lepay et al., 1983, identificaron glicoproteínas membranales del parásito 66-65 kDa con marcje radiactivo en promastigotes de *L. tropica*, *L. donovani*, *L. major*, *L. m. amazonensis* y *L. m. mexicana*. Sin embargo la glicoproteína de 97 kDa. no ha sido reportada como una de las más abundantes en estas especies lo que marca una diferencia importante entre *L. mexicana mexicana* y *L. mexicana*, que tenemos en el laboratorio ya que esta *L. mexicana* no presenta la leishmaniasis cutánea común sino una diseminada y es importante destacar cualquier diferencia que se encuentre entre las líneas de *Leishmania*, lo cual tal vez pudiera servir como una prueba para discernir entre cepas, ya que como propone Handman y Goding, 1981, pequeñas diferencias en la glicosilación pueden estar acompañadas en diferencias en el reconocimiento inmune entre las especies de *Leishmania*. De las proteínas totales de *Leishmania* transferidas a papel de nitrocelulosa (PNC) y reveladas con <sup>4</sup>Cl-Naftol, se evidenciaron 19 glicoproteínas y detectamos marcada muy fuertemente a la glicoproteína de 36 kDa.

Haciendo una comparación entre las glicoproteínas identificadas por la Con A en geles de poliacrilamida con las identificadas en PNC, se encontró que aunque en el gel se apreciaron aproximadamente 20 bandas específicas, 14 glicoproteínas con pesos moleculares muy similares (fig. 4) aparecen en el gel y en el papel. En el gel las glicoproteínas con peso molecular aproximado 97, 70, 53, 38, y 36 kDa se visualizan como bandas muy evidentes, lo cual nos sugiere que son glicoproteínas

abundantes en el parásito. Se encontraron diferencias en la intensidad de las glicoproteínas de 122, 118, 99 y 36 kDa identificadas en el PNC con las observadas directamente en el gel. En el papel se observó que la glicoproteína con un peso molecular de 36 kDa, presenta una tinción muy evidente.

Comparando los geles teñidos con azul de Coomassie con los tratados con Con A, podemos observar claramente como la proteína de 53 kDa, teñida con azul presenta una marca muy fuerte y la proteína de 36 kDa no, sucediendo lo contrario con los geles tratados con la lectina Con A; además, con la utilización de azúcar inhibidor para Con A, el  $\alpha$ -metil-manopiranososa y los controles utilizando peroxidasa y DAB, tanto en PNC como en los geles, descartamos la posibilidad de que los resultados obtenidos fueran artefactos de la reacción y por lo tanto decimos que las glicoproteínas de Leishmania mexicana identificadas específicamente por Con A en el PNC y el gel presentan azúcares terminales del tipo manosa o glucosa, además es importante destacar que no se encontró ningún reporte en el que se presenten evidencias de que las glicoproteínas de 118 y 36 kDa, sean tan intensamente marcadas como las que se observaron en el caso del parásito L. mexicana.

Motivados por las bandas observadas en los geles de poliacrilamida, los parásitos se incubaron con DAB, para tratar de localizar las peroxididas endógenas que aparecían en el gel, esta reacción nos permitió observar una marca electrondensa que se presentó reproduciblemente en toda la membrana mitocondrial así como en sus crestas, se realizaron repeticiones para ver si no había sido algún artificio y se encontró que los resultados obtenidos eran reproducibles, con estos resultados y con la idea de que tal vez lo que se observaba era algún citocromo se realizaron experimentos de inhibición para el citocromo oxidasa con cianuro de potasio, bloqueando así cualquier transporte electrónico y verificar efectivamente que éste complejo era el que se estaba evidenciando, de esta

manera se encontro que al incubar al parasito con el cianuro no encontramos marca alguna.

Basandonos en estudios realizados por Hill y Cross. 1973, Martin y Mikkada, 1979, en los que mediante analisis espectral reportan la presencia de citocromos, así como los de Shaw y Simpson, 1989, quienes mediante la purificación de las mitocondrias y analisis espectral evidencian actividad de citocromo. De ésta manera aparentemente logramos detectar a nivel celular el citocromo oxidasa, el cual no corresponde a la banda observada en el gel de poliacrilamida cuando este fue incubado con DAB, sin embargo ésta metodología no ha sido reportada con anterioridad además de ser una metodología reproducible y sencilla, que podria utilizarse como un método específico para el marcaje mitocondrial de promastigotes de Leishmania mexicana.

Creo que el hecho de haber evidenciado las glicoproteinas de 118 y 36 kilodaltons con la intensidad que se ve en las figuras 2, nos habla de la abundancia y de la gran afinidad que presentan estas proteinas a la lectina Concanavalina A, por lo que creo sería importante encontrar posteriormente su localización y su función biológica esto sería de gran interes ya que como lo reporta Ayesta et al., 1985 la Concanavalina A solo se une a cepas patogenas del parasito de L. braziliensis, lo cual nos habla de la importancia de las glicoproteinas presentes en el parasito Leishmania.

**CONCLUSIONES :**

- 1.- El parásito Leishmania mexicana, presenta receptores específicos a la lectina Concanavalina A.
- 2.- La imagen electroforética y la inmunoelectrotransferencia nos permitieron observar que los promastigotes de Leishmania mexicana presentan aproximadamente de 6 a 7 proteínas con afinidad a Con A, lo que nos indica la presencia de glicoproteínas con manosa y/o glucosa.
- 3.- Se observó que los promastigotes de Leishmania mexicana tratados con diaminobenzidina, presentan una reacción electrodensa en la membrana interna mitocondrial, que se inhibe en presencia de KCN, lo que nos indica que probablemente detectamos a la citocromo oxidasa.
- 4.- Además mediante la inmunoelectrotransferencia, detectamos una marca muy intensa de las glicoproteínas de 118 y 36 kDa, lo que representa la gran afinidad a Con A de éstas glicoproteínas, las cuales no se han encontrado en otros reportes.

## APENDICE

### TECNICA DE INCLUSION EN EPON.

- 1.- Las células se posijan con  $\text{OsO}_4$  1% en cacodilatos 0.1M pH 7.2 una hora a temperatura ambiente.
- 2.- Se lavan 2 veces con cacodilato 0.1M pH 7.2
- 3.- Se elimina el sobrenadante en la campana de extracción
- 4.- Se comienzan a deshidratar las muestras utilizando alcoholes en porcentaje creciente.
  - Poner alcohol 70%, resuspender y dejar 10 minutos
  - Centrifugar 5 minutos y eliminar el sobrenadante
  - Alcohol 85%, resuspender e incubar 10 minutos
  - Centrifugar 5 minutos y eliminar el sobrenadante
  - Alcohol 90%, resuspender e incubar 10 minutos
  - Centrifugar 5 minutos y eliminar el sobrenadante
  - Alcohol 95%, resuspender e incubar 10 minutos
  - Centrifugar 5 minutos y eliminar el sobrenadante
  - Alcohol absoluto, resuspender e incubar 10 minutos
  - Centrifugar 5 minutos y eliminar el sobrenadante
- 5.- Poner a la muestra, Oxido de propileno 20 min.
- 6.- Centrifugar 5 min. y eliminar el sobrenadante
- 7.- Agregar a la pastilla una mezcla 1:1 de Epón-Oxido de Propileno, resuspender bien la pastilla y dejar una hora.
  - a) Poner en un tubo de ensayo una cantidad determinada de Epón (debe de estar a temperatura ambiente), sacar la resina con pipeta
  - b) Agregar un volumen igual al de la resina (Epón) y de Oxido de Propileno.
  - c) Mezclar muy bien con un palillo
- 8.- Centrifugar 5 min. y eliminar un poco de resina
- 9.- Agregar una mezcla de Epón 2:1 con Oxido de Propileno
- 10.- Resuspender muy bien la pastilla y dejarlo toda la noche, tapar muy bien el eppendorf.
- 11.- Centrifugar 5 min.
- 12.- Eliminar un poco de volumen de la mezcla 2:1 y resuspender nuevamente la pastilla
- 13.- Pasar las células embebedas en la mezcla (2:1) a un mini eppendorf
- 14.- Centrifugar 5 min
- 15.- Eliminar todo el sobrenadante (mezcla 2:1)
- 16.- Agregar Epón (a la mitad del mini eppendorf)
- 17.- Centrifugar 5 minutos.
- 18.- Completar con Epón y llenar el mini-eppendorf, conteniendo una etiqueta de identificación y polimerizar en estufa a 60°C, durante 2 días.

Soluciones utilizadas para preparar geles de poli(acrilamida):

Sol. A: Solución de Acrilamida al 30%.

Acrilamida 30 g.  
Bis-Acrilamida 8g.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desionizada aforar a 100 ml.

Esta solución se filtra y se guarda en frasco ambar y se guarda en el cuarto frío.

Sol. B Trizma base 36.3 g.  
Hcl 1 N. 4.0 ml.  
H<sub>2</sub>O desionizada aforar a 100 ml.

Esta solución debe tener un pH de 8.8 a 9, también se filtra y se guarda en refrigeración.

Sol. C Trizma-base 5.98g.  
Hcl 1N. 4.0 ml.  
H<sub>2</sub>O aforar a 100 ml.

Esta solución debe tener un pH de 6.8 a 6.6, también se filtra y se guarda en refrigeración.

Sol. D SDS al 10% 10 g.  
H<sub>2</sub>O aforar a 100 ml.

Sol. E Persulfato de amonio 0.1g.  
H<sub>2</sub>O deionizada 1 ml.

Esta solución se prepara momentos antes de usarse.

Sol. F TEMED 0.010 ml.

El azul de Bromofenol se usó al 0.02% final y el β-mercapto etanol al 0.5% final.

#### METODO DE LOWRY- MODIFICADO.

Una vez obtenida la proteína de Leishmania, se procede a determinar su concentración por el método de Lowry.

- 1.- Lo primero que se hace es una curva estándar utilizando Albumina de Suero Bovino (BSA), de la siguiente forma.
- 2.- Se hace una solución stock de BSA 1 mg/ml disuelta en agua, y se toman los siguientes volúmenes de albúmina: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μl. Para eliminar los detergentes de la muestra problema, como el SDS, la muestra se resuspende en 200 μl de DOC (deoxicolato de Sodio 0.15%) y se agita en vortex, durante 5 min. Luego se adiciona TCA (Acido Tricloroacético al 70%), frío y se

resuspende perfectamente bien, se incuba nuevamente durante 5 min. en hielo. Terminada la incubación, la muestra se centrifuga a 2000 r.p.m., durante 5 min. y se elimina el sobrenadante. A la pastilla se le adicionan 200  $\mu$ l de agua destilada, se resuspende perfectamente con el vortex, y se le agrega 1 ml de la Solución C, se agita nuevamente y se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se agrega 0.1 ml del reactivo de Folin (1-1) y se incuba a temperatura ambiente por 45 min ó bien se hierven todas las muestras, incluyendo las de la curva patrón (albumina 0,10,20,30,40,50,  $\mu$ g ) por 5 min. La absorbancia de las soluciones se mide en un espectrofotómetro a 660 nm.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander James and Keith Vickerman (1975). Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of Leishmania mexicana. Infecte Macrophages. J. Protozool vol. 22 No. 4: 502-508.
- 2.- Anderson W.A; Bara Gonul and Seligman M.A. (1975). The ultrastructural localization of cytochrome oxidase via cytochrome c. The Journal of Histochemistry and cytochemistry. vol. 89: 269-275.
- 3.- Angermüller S. and Fahimi (1981). Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3', 3' diamino-benzidine. Histochemistry. vol. 71: 33-34.
- 4.- Ayesta C, Carlos Argüello and Angel G. Hernández (1985). Leishmania braziliensis: Cell surface differences in promastigotes of pathogenic and non pathogenic strains. Experimental Parasitology. vol. 59: 185-191.
- 5.- Bates Paul A, Gottlieb Michael and Dennis, M. Dwyer (1988). Leishmania donovani: Identification of glycoprotein release by promastigotes during growth in vitro. Experimental Parasitology vol. 67: 199-209.
- 6.- Blackwell Janefer M. and James Alexander (1983). The macrophage and parasitic protozoa. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 77 No. 5: 636-645.

- 7.- Bordier C. (1987). The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitology Today* vol. 3 No. 5: 151-153.
- 8.- Bray R.S. (1983). *Leishmania*: Chemotaxic responses of promastigotes and macrophages *in vitro*. *J. Protozool.* vol.30 No. 2: 322-329.
- 9.- Brow, H. and Neva, F. (1983). Basic clinical parasitology. Blood and Tissue protozoa of human beings. Capitulo 4. Apleton-Crotts 5a.edition: 55-76.
- 10.- Buchmüller Yolande, Roviller and Jaques Maüel (1986). Correlation between enhanced oxidative metabolism and leishmanicida activity inactivated macrophages from healer and nonhealer mouse strains. *J. of Immunology.* vol. 136: 3884-3890.
- 11.- Button, L.L. and McMasteer, R.W. (1988). Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. *J. Exp. Med.* vol. 167:724-729.
- 12.- Chang Kwang-Poo (1981). *Leishmania donovani* promastigotes macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens: Characterization *in vitro* by radio isotopic assay. *Molecular and Biochemical Parasitology.* vol 4: 67-76.
- 13.- Chang K. P. (1983). Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *International Review of Cytology, supplement.* vol 14: 267-305.

- 14.- Chang Poo Kwang and Dwyer M. Dennis (1976). Multiplication of a human parasites (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. Science. vol. 193: 678-683.
- 15.- Chang K. P., Fong, Dunne and Bray R.S. (1985). a: Capitulo 1. Biology of Leishmania b: The biochemistry of Leishmania surface membranes. Elsevier Science Publisliier B.V.
- 16.- Chang K. P and J. W. Chiao (1981). Cellular immunity of mice to Leishmania donovani in vitro: Lymphokine mediated killing of intracellular parasites in macrophages. Proc. Natl. Academ. Sci. USA. vol. 78 No. 11: 7083-7087.
- 17.- Chang Chin Shen, Thomas Joseph Inerra, Jhon Alan Kink, Dunne Fong and Kwang-Poo Chang. (1986). Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of Leishmania mexicana amazonensis. Molecular and Biochemical Parasitology vol. 18: 197-210.
- 18.- Chanon, J. M. Roberts and J. Blackwell (1984). A study of the differential respiratory burst activity elicited and promastigotes and amastigotes of Leishmania donovani in murine resident peritoneal macrophages. Immunology vol. 53: 345-350.
- 19.- Dwyer M.D. and Gottlieb Michael (1983). The surface membrane chemistry of Leishmania: Its possible role in parasite sequestration and survival. J. Cell. Biochemistry. vol. 23: 35-45.

- 20.- El-On J. Bradley D.J. and Freeman J. (1980). Leishmania donovani: Action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Experimental Parasitology*, vol 49: 167 -174.
- 21.- El-On and Schnur L. F. (1974). Purification and preliminary characterization of Leishmania excreted factors (EF). *Journal of Protozoology Supplement* vol. 21: 463-464.
- 22.- Etges Robert, Bouvier Jacques and Bordier Cl  men (1986) The major surface protein of Leishmania promastigote is a protease. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.261: 9098-91001.
- 23.- Fong Dunne and Kwang-Poo Chang (1981). Tubulin biosynthesis in the developmental cycle of a parasitic differentiation of motile and non motile stage. *Natl. Aca. Sci. U.S.A.* vol.78: 7624 - 7628
- 24.- Fong Dunne and Kwang-Poo Chang (1982). Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, Leishmania mexicana. Changes during differentiation of motile and non motile stage. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 79: 7366 - 7370.
- 25.- Gardiner R. Peter and Dennis M. Dwyer (1983). Radio iodination and identification of externally disposed membrane components of Leishmania tropica. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 8: 283 - 295

- 26.- Gottlieb Michael and Dennis M. Dwyer. (1981). Leishmania donovani; surface membran acidphosphatase activity of promastigotes. Experimental Parasitology vol. 52: 117 - 128.
- 27.- Hernández Angel G., Rodríguez Noris, Dagger Facehull and Grenblatt Charles L. (1980). Producción and secretion of Leishmania braziliensis proteins. Molecular and Biochemical Parasitology. 48 - 65.
- 28.- Hill, G. C. and Cross, G. (1973). Cyanide resistant respiration and branche cytochrome chain system in kinetoplastida. Biochemica et Biophysica Act. 305: 590 - 596.
- 29.- Katakura Ken and Akko Kobayashi (1988). Acid phosphatase activity of virulent clones of Leishmania donovani promastigotes. Infection and Immunity. 2856 - 2860.
- 30.- Kreir, J.P (1977). Parasitic protozoa. Leishmania. Cap III Editorial Acaademic, Press, INC. vol. 1: 58 - 133.
- 31.- Lalson, R. (1982). The american leishmaniasis some observations on their ecology and epidemology. Trans Roy. Soc. Trop.Med. Hyg. vol. 77: 579 - 583.
- 32.- Lepay D.A., Nogueira N. aand Cohn. (1983).Surface antigens of Leishmania donovani promastigotes J. Exp. Med. vol. 157: 1562 - 1572.

- 33.- Lovelace K. James, Dwyer M. Denis and Gottlieb Michael. (1986). Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of Leishmania donovani. Molecular and Biochemical Parasitology vol. 20: 243 - 251.
- 34.- Lumsden, W. H. R, and Evans, D. A. (1976). Biology of the kinetoplastida. Ed. Academ Press, London vol. 1: 563.
- 35.- Mahmoud, AAF and Warren, KS. (1977). Algorithms in the diagnosis and monogement of exotic diseases XXIV.
- 36.- Mansfiel, J. (1984). Parasitic diseases. The chemolerypy of leishmaniasis. Capitulo V. Ed. Marcel Dekker INC. vol. 12: 201 - 229.
- 37.- Manson-Bahr, P. E. C. and Apted, F. J. C. (1982). Tropical diseases. Ed. Bailliere Tindall 18 th. Edition Manson's. London 845.
- 38.- Martín, E and Mukkada A. (1979). Identification of the terminal respiratory chain in kinetoplast mitochondrial complexes of Leishmania tropica promastigote. Journal of Biological Chemistry vol. 254: 12192 - 12198.
- 39.- Murray Henry W. (1981). Interaction of Leishmania with a macrophage cell line. J. Exp. Med. vol. 153: 1690-1695.
- 40.- Murray Henry W, George L. Spilny and Carl F. Nathan (1985). Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon  $\alpha$ . J. Immunol. vol. 134: 1619 - 1622.

- 41.- Parish W. R., Schmidling and Müller V. (1977). The effects of proteases on proteins and glycoproteins of Dictyostellum discoideum plasmatic membranes. *Experimental Cell Research*. vol. 110: 267 - 276.
- 42.- Passwell Justen H, RRuth Shor and Jacob Shoham (1986). The enhancing effect of intereferon  $\beta$  and  $\alpha$  on the killing of Leishmania tropica major in human mononuclear phagocytes in vitro. *J. Immunol.* vol. 136: 3062 - 3066.
- 43.- Ramaley S, Kuhns A, Basford R, Grew R, and Kaplan S. (1984). Leishmanial fosfalase blocks neutrophil  $O_2$  production. *J. Biol. Chem.* vol. 259: 1173 - 1178.
- 44.- Rodriguez, M. M., Xavier, M.T, Mendoza Previato, L, and Barcinski M. A. (1988). Novel 17 kilodalton Leishmania antigen revealed by immunochemical studies of a purified glycoprotein fraction recongnized by murine T lymphocytes. *Infect. Immun.* vol. 56: 1766 - 1770.
- 45.- Russell G, David and Wilhem Heike. (1986). The Involment of the major surface glycoprotein (gp 63) of Leishmania promastigotes. *The Journal of Immunology*. vol. 136: No. 7: 2613 - 2520.
- 46.- Sacks D. and daSilva R. P., (1987). The generation of infective stage Leishmania major promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolip. *J. Immunol.* vol. 139: 3099 - 3106.

- 47.- Saraiva Eivira M.B. Andrade Arnold F.B.(1986). Cell surface carbohydrate of Leishmania mexicana amazonensis differences between infective and non-infective forms. European Journal of cell Biology, vol. 40: 19 - 255.
- 48.- Seligman A. M., Karnousky J. M., Waserkrug H.L. and Hanker J.S. (1968). Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). The Journal of Cell Biol. vol. 38: 1 - 13.
- 49.- Shaw Janet M. and Simpson Larry (1989). Characterization of a protein fraction containing cytochromes b and c<sub>1</sub> from mitochondrial of L. tarentolae. Experimental Parasitology vol. 68: 443 - 449.
- 50.- Spencer H. (1973). Tropical pathology leishmaniasis and trypanosomiasis. Capitulo 12. Editorial W.D.G.S. E. U. 352 - 396.
- 51.- Slutzky G.M. and Greenblatt, C. L. (1977). Febs Lett vol 80: 401 - 409.
- 52.- Turco, 1988. The lipophosphoglycan of Leishmania. Parasitol Today. vol. 4: 255 - 257.
- 53.- Velasco, O. (1987). Las leishmaniasis en México. Rev. Latmer. Microbiol. vol 29: 119 - 126.
- 54.- Velasco O, Stephen J.Sarino, Bryte C, Walton, Albert A. Gram and Franklin A. Neva (1989). Diffuse cutaneous leishmaniasis in México, Am. J. Trop. Med. Hyg. vol.3 No. 4: 280 - 289.

- 55.- Wilford Olsen, O. (1974). Animal Parasites. Their life cycles and ecology. University Park, Press, Baltimore. 549.
- 56.- Wilson, M. E. and Pearson, R. D. (1988). Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. vol. 56: 363 - 536.
- 57.- Wright E. Pamela and El Rouface Mohammed El amin. (1989). Leishmania infection: Surfaces and immunity. Biochem. Cell. Biol. vol. 67: 525 - 536.
- 58.- Zenian A. (1981). Leishmania tropica biochemical aspects of promastigotes attachment to macrophage in vitro. Exp. Parasitol. vol. 51: 175 - 179.