

11261

5
Ej2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACION PARCIAL DEL FACTOR EXCRETOR
DE LEISHMANIA MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
DEL AREA DE PARASITOLOGIA

P R E S E N T A :

PATRICIA SOFIA GORCICA ROSETE

DIRECTOR DR. EDGAR A ZENTENO GALINDO
CO-DIRECTOR DRA. AMALIA MONROY OSTRIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F. 1993



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.

I N D I C E

I.	RESUMEN	1
I.	INTRODUCCION	3
III.	ANTECEDENTES	
III.1	Clasificación de las Leishmanias	5
III.2	Leishmaniasis en México.	7
III.3	Biología de la Leishmania	9
III.4	Relación huésped-parásito.	13
III.6	Características y composición bioquímica de la superficie celular de Leishmania.	19
III.7	Utilización de lectinas como herramienta de identificación y estudio de los glicoconjugados de superficie de Leishmania.	24
IV.	OBJETIVOS	27
V.	HIPOTESIS	28
VI.	JUSTIFICACION DEL TRABAJO	29
VII.	MATERIAL Y METODO	30
VIII.	RESULTADOS	41
IX.	DISCUSION	54
X.	CONCLUSION	66
XI.	BIBLIOGRAFIA	68

R E S U M E N

Las leishmanias son parásitos intracelulares de macrófagos, los cuales necesitan de un díptero y un vertebrado para completar su ciclo de vida. Estos parásitos presentan una fase de promastigote flagelado que se encuentra en forma natural en el tubo digestivo del mosquito vector, pero también se puede desarrollar en el laboratorio en medios de cultivo y una fase de amastigote aflagelar intracelular en el huésped vertebrado.

En la superficie celular de la leishmania se encuentran moléculas de lipofosfoglicana (LPG) que también pueden ser excretadas al medio de cultivo. La LPG o factor excretor es muy abundante en la superficie del parásito, encontrándose más de un millón de copias, su papel biológico es participar en la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago, al conferirle virulencia y modular la respuesta inmune del huésped.

El objetivo de este trabajo es aislar, purificar y caracterizar la LPG de 4 cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas, utilizando para su purificación columnas de cromatografía de afinidad con 2 lectinas, la Con A y la de lenteja, así como determinar algunas de sus actividades biológicas sobre macrófagos.

Se encontraron diferencias en la composición sacarídica de las 4 cepas analizadas, teniendo como carbohidratos comunes Galactosa, Manosa, Glucosa y N-acetil glucosamina, pero en todos los casos en diferentes proporciones.

En la fracción retenida por la columna de Con A, para las 4 cepas se encontraron moléculas inmunodominantes, identificadas con anticuerpos de conejo contra la LPG por inmunodifusión. La lectina de lenteja no fue capaz de reconocer a la LPG.

Se incubaron macrófagos peritoneales de ratones Balb/C con diferentes concentraciones de las fracciones de LPG purificadas con Con A, disminuyendo significativamente el índice fagocítico en los macrófagos incubados con 2 hasta 0.4 $\mu\text{g/ml}$ de la LPG. Concentraciones mayores o menores a este rango no presentan diferencias con respecto al control. Estos resultados fueron inhibidos al preincubar los macrófagos con α -Metil Manósido 0.2 M, no encontrándose diferencias con el control, lo que sugiere la utilización de receptores para manosa en este proceso; además de existir una dosis dependencia, o la posible existencia de 2 receptores con diferente afinidad para la LPG.

I N T R O D U C C I O N

Las leishmaniasis son infecciones intracelulares causadas por varias especies del género *Leishmania*, las cuales son transmitidas por la picadura de dípteros hembras del género *Lutzomyia* en América y del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África.

Esta enfermedad afecta al hombre y a otros vertebrados de importancia económica y es considerada entre las enfermedades tropicales importantes por la Organización Mundial de la Salud, por ser cosmopolita a excepción de Australia y afectar a más de 12,000,000 de personas al año. (WHO.tropical diseases, 1990).

En México no se ha llegado a establecer con precisión, la incidencia anual y la mortalidad, así como tampoco la distribución geográfica exacta, ni los reservorios ni transmisores, pero se han reportado todas las formas clínicas de leishmaniasis, tales como el Kala-azar o leishmaniasis visceral (LV), la espundia o leishmaniasis mucocutánea (LMC), la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) así como la leishmaniasis cutánea diseminada (LCD); esto habla de un problema de salud grave, ya que estas formas clínicas por su severidad, además de repercutir en la salud del individuo, también tienen efectos psicosocioeconómicos importantes.

En todos estos casos, los amastigotes localizados dentro de los macrófagos, son morfológicamente idénticos a los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* y a los de las distintas especies de *Leishmania*, pero la enfermedad producida es clínicamente diferente, por lo que se han recurrido a otros criterios como los anatomoclínicos, inmunológicos, moleculares y bioquímicos para clasificarlas y estudiarlas.

Las moléculas de superficie del parásito son importantes porque están relacionadas con la patogenicidad, con la interacción con el sistema inmune y para el reconocimiento y sobrevivencia del parásito dentro de la célula huésped.

Por lo anterior se considera de interés de estudiar las estructuras de estas moléculas y su interacción con el huésped, sobre todo la estructura y función del glicoconjugado complejo llamado Factor Excretor o lipofosfoglicana, al que se le atribuyen una serie de importantes funciones en la interacción huésped-Parásito.

ANTECEDENTES

CLASIFICACION DE LAS LEISHMANIAS

Pertenece al Phylum Sarcostigophora (Honigberg y Balamuth, 1963), Subphylum Mastigophora (Diesing, 1866), Clase Zoomastigophorea (Calkins, 1909), Orden Kinetoplastida (Honigberg, 1963), Suborden Trypanosomatina (Kent, 1880), Familia Trypanosomatidae, Género *Leishmania* (Levin, 1980).

Antiguamente la clasificación del género se basaba en las diferentes manifestaciones clínicas y en aspectos epidemiológicos. Más tarde se propusieron métodos bioquímicos de clasificación, como la determinación de isoenzimas, análisis del coeficiente de sedimentación del DNA nuclear y del cinetoplasto y por anticuerpos monoclonales (Monroy, 1986).

El género *Leishmania* es tan heterogéneo que actualmente se encuentra agrupado en 4 complejos y a cada uno de ellos pertenecen diferentes sub-especies (Monroy, 1986):

- 1) Complejo *L. tropica*. Produce leishmaniasis cutánea (LC) y se localiza en países de Asia, África y Europa. Se transmite por dípteros del género *Phlebotomus*.
- 2) Complejo *L. donovani*. Produce leishmaniasis visceral (LV) y ocasionalmente algunas especies producen leishmaniasis cutánea difusa del viejo mundo. Se le encuentra en algunos países de Asia, África y Europa, se transmite por dípteros del género *Phlebotomus*. En Sudamérica se encuentra una sub-especie que es *L. donovani chagasi*, que es transmitida por *Lutzomyia longipalpis* y en México han sido reportados varios casos.
- 3) Complejo *L. braziliensis*. Produce la mayoría de las leishmaniasis muco-cutánea del nuevo mundo, incluyendo a México.

4) Complejo *L. mexicana*. Se encuentra unicamente en el nuevo mundo y está compuesto por las siguientes sub-especies:

a) *L. mexicana mexicana*. Ocasiona la úlcera de los chicleros, rara vez ocasiona LCD. Tiene como reservorios a roedores selváticos. Su transmisor es *L. olmeca olmeca* y se encuentra distribuida en Yucatán, Tabasco, Chiapas e Istmo de Tehuantepec, así como en la región de los Tuxtlas, Guatemala y Belice.

b) *L. mexicana amazonensis*. Es rara la infección en el hombre porque el transmisor *L. flaviscutelata* es de hábitos nocturnos y no es antropofílico. Produce leishmaniasis diseminada, así como úlceras localizadas.

c) *L. mexicana pifanoi*. Es causante de LCD en el hombre y es transmitida por *L. flaviscutelata*. Se localiza en Venezuela, cuenca del Amazonas y Brasil.

LEISHMANIASIS EN MEXICO

FORMAS CLINICAS

LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA (LCL) O ULCERA DE LOS CHICLEROS.

Esta forma clínica es producida por *L. mexicana mexicana*. Su distribución va desde la frontera con los Estados Unidos hasta la península de Yucatán y desde Chiapas a Nayarit.

Esta forma se caracteriza generalmente por una ulceración pequeña y única, aunque puede ser grande y múltiple, si el transmisor picó varias veces al huésped o fué picado por varios insectos.

En la mayoría de los casos tiende a la curación espontánea en 6 a 24 meses, siempre y cuando no se localice en el pabellón auricular, la lesión se vuelve crónica y puede llegar a mutilarlo. (Velasco, 1987)

LEISHMANIASIS CUTANEA DISEMINADA (LCD).

Es de presentación esporádica y se encuentra distribuida desde el sur de Texas y Coahuila a Chiapas. No se ha reportado hasta el momento en Yucatán ni Quintana Roo. También es producida por *L. m. mexicana*.

Se ha observado que en épocas calurosas el enfermo sufre de remisión espontánea de las lesiones y en ese momento las intradermoreacciones (IDR) a leishmanina se vuelven positivas. Estas remisiones también se han observado en pacientes con

infecciones virales como dengue (Velasco, 1991).

LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA (LMC) O ESPUNDIA.

Infeción producida por *L. braziliensis braziliensis*. Solamente se han encontrado casos en Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca (Velasco, 1989).

Presentan lesiones destructivas de las mucosas nasal y orofaríngea, que puede entorpecer la fonación y la deglución e incluso causar inanición, debido al intenso dolor. No cura espontáneamente y es muy resistente a la quimioterapia específica.

LEISHMANIASIS VISCERAL (LV) O KALA-AZAR.

Es causada en México y Latinoamérica por *L. donovani chagasi*. En México se han encontrado 8 casos en Huitzuco, Gro. (en la cuenca del río Balsas), aparentemente es la única zona endémica del país, también se han encontrados casos aislados en Puebla, Oaxaca y Morelos.

La LV se puede presentar en tres modalidades: la endémica, la esporádica y la epidémica, habiendo en México solo las dos primeras, que una vez caracterizadas como tal, no curan espontáneamente y llevan al paciente a la muerte (Velasco, 1989).

BIOLOGIA DE LA LEISHMANIA

CICLO BIOLÓGICO

Las leishmanias son parásitos heteróxeos, es decir que necesitan 2 huéspedes para realizar su ciclo biológico (un díptero y un vertebrado). Parte de su ciclo lo realiza en el intestino del mosquito en donde toma la forma de promastigote y el resto de su ciclo lo completa en los tejidos de los vertebrados, en los que se encuentra solo la forma de amastigote.

Los huéspedes vertebrados de *Leishmania* spp, generalmente son mamíferos a excepción de unas cuantas especies que pueden parasitar lagartijas. Los dípteros de los géneros *Lutzomyia* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo, son los huéspedes mas importantes y vectores de la leishmaniasis.

Cuando los dípteros chupan la sangre de un huésped vertebrado, ingieren los amastigotes. Estos pasan al intestino medio, en donde se transforman en promastigotes y se multiplican por fisión binaria. Los parásitos se adhieren a las paredes del intestino, también se les puede encontrar en el intestino anterior y posterior del mosquito. Hacia el 4 o 5 día de la picadura se desarrollan promastigotes en el esófago y en la faringe. Cuando las leishmanias empiezan a obstruir el esófago, el mosquito al estar alimentándose, expulsa su contenido esofágico hacia el exterior para eliminar la obstrucción y de esta manera inocular los promastigotes en la piel de la víctima. También se ha encontrado la transmisión cuando se aplasta a los mosquitos contra la piel lesionada o mucosas.

Una vez dentro del huésped mamífero, los parásitos son fagocitados inmediatamente por los macrófagos, donde se multiplican rápidamente por fisión binaria, matando a la célula huésped. Los parásitos salen inmediatamente de la célula muerta, y penetran a otros macrófagos a los que también destruyen, por este mecanismo es como

van ocasionando los daños al huésped (Schmidt, 1983).

MORFOLOGIA

De las dos fases del parásito, el amastigote que vive dentro de los macrófaos su forma es ovoide y mide de 2 a 3 μ de longitud, con un núcleo, blefaroplasto y cinetoplasto. El flagelo se reduce a una fina fibrilla totalmente incluida en el citoplasma; no presenta flagelo libre.

El promastigote, es alargado y con un gran núcleo. Hay un flagelo libre de tamaño pequeño de 15 a 28 μ de largo, que se origina en un cinetoplasto localizado en el extremo anterior del cuerpo. Mide de 15 a 25 μ de largo por 1.5 a 3.5 de ancho.

En los cultivos se pueden observar formas de flagelo largo, como el descrito anteriormente, pero también se pueden encontrar formas flageladas cortas y anchas, así como formas de promastigotes redondas de 4 a 5 μ de diámetro, pero con un flagelo muy largo. En cultivos viejos, se encuentran muchas formas degenerativas, en las cuales la morfología típica se ha perdido. En el intestino del mosco, se encuentran formas idénticas a los cultivos (Chester, 1991).

METACICLOGENESIS

La generación de promastigotes no infectivos, así como las formas metacíclicas infectivas han sido reportadas para algunas especies de leishmanias. A este proceso se le conoce como metaciclogénesis. El estado infectivo in vitro corresponde a la fase estacionaria del crecimiento del parásito, en cambio la fase no infectiva corresponde a la fase logarítmica de crecimiento (Sacks, 1992).

Este proceso presenta cambios muy marcados tanto en la morfología como las características bioquímicas y fisiológicas para algunas

especies, tales como en *L. major* en la que se realizan los siguientes cambios (Chang, 1990):

a) cambios en la longitud del parásito en la fase de crecimiento logarítmica y transformación a formas activamente móviles en la fase estacionaria.

b) cambios bioquímicos y antigénicos en los azúcares terminales de una molécula de superficie llamada fosfolipoglicana o LPG, relacionada con la sobrevivencia y virulencia del parásito, resultando en la adquisición de resistencia a la citólisis mediada por complemento y en la pérdida de la aglutinabilidad para las lectinas específicas para lactosa. Estos 2 cambios aparentemente son menores en las leishmanias de nuevo mundo, o no han sido debidamente estudiados.

Otros cambios que le ocurren a las leishmanias es durante el paso del mosquito al huésped mamífero, en primer lugar por el cambio de temperatura. In vitro se ha visto que el cambio de temperatura de 35 a 37°C originan la pérdida de la movilidad en especies de Leishmanias del nuevo mundo y los parásitos empiezan a redondearse.

Estos permanecen viables por un tiempo y después adoptan formas parecidas a amastigotes y pueden seguir viviendo igual que si tuvieran las condiciones óptimas, pero no son infectivos, ni se reproducen.

En presencia de macrófagos, los promastigotes permanecen flagelados y móviles un largo periodo de tiempo y se diferencian a amastigotes dentro del macrófago muy lentamente.

El hecho de que los amastigotes se encuentren en el fagosoma del macrófago y que son metabólicamente activos al pH ácido, lo que sugiera que son acidófilos y resistentes a las enzimas del medio o que tienen algún mecanismo para protegerse. Handman y

Greenblat, (1977) encontraron que los promastigotes y amastigotes in vitro liberan una liposfosfoglicana compleja llamado Factor Excretor o LPG, que puede intensificar el crecimiento del amastigote en macrófagos peritoneales de roedores normalmente resistentes, además de darle otras propiedades al parásito (Handman, 1977).

La capacidad biosintética de la leishmania es tal, que es importante considerar: a) crecimiento como parásito intracelular, b) su resistencia a los factores microbicidas del macrófago y c) la capacidad de modular la inmunidad del huésped.

RELACION HUESPED-PARASITO

Diversos autores han demostrado diferencias en la infectividad de los promastigotes dependiendo de la fase de crecimiento del parásito en cultivo (Channon, 1986).

Los primeros mecanismos de defensa que deben salvar los promastigotes de leishmania son los factores humorales y celulares inespecíficos.

Se ha visto que los promastigotes no infectivos activan la vía alterna del complemento y son rápidamente lisados por los componentes del suero, pero los promastigotes metacíclicos infectivos, son parcialmente resistentes a la muerte por componentes del suero y son incapaces de activar la vía alterna del complemento, pero estos últimos por sí solos activan eficientemente la vía clásica con la fijación de C3 (80% C3b) en la superficie del parásito. (Bodgam, 1990).

Esta sobrevivencia de los promastigotes metacíclicos a los componentes del complemento es debida en parte a la activación de la vía clásica, pero también intervienen una serie de moléculas presentes en la superficie del parásito.

La glicoproteína gp63 y la lipofosfoglicana (LPG) son 2 de las moléculas mejor caracterizadas de la superficie de la leishmania, ambas moléculas que intervienen en el proceso de reconocimiento por el macrófago y funcionan como ligandos para varios receptores de los macrófagos. Entre los receptores mas importantes de reconocimiento del macrófago están los receptores para complemento CR1 (= C3bR) y el CR3 (= C3iR). (Bodgam, 1990).

En las condiciones naturales de infección participan los componentes del sistema del complemento, se ha demostrado que los macrófagos son capaces de producirlos para la activación de la vía

alterna del complemento depositando C3bi en la superficie del parásito. (Russell, 1989).También se ha encontrado otro tipo de receptores en el macrófago que participan en el reconocimiento del parásito, y son receptores parecidos a lectinas (Chang, 1981). Se observó que agregando oligosacáridos ricos en manosa a cultivos de macrófagos con leishmanias, se inhibía la fagocitosis (Wilson, 1986).

La secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) de la glicoproteína de superficie de leishmania (gp63), participa en el reconocimiento y adhesión al macrófago. Esta secuencia también se encuentra presente en la fibronectina. La anti-fibronectina reconoce a la gp63 y este reconocimiento puede ser bloqueado por un péptido sintético con esa secuencia. Por lo que el sitio de reconocimiento de la gp63 debe ser estructuralmente similar al receptor de la fibronectina. También se encontró que los anticuerpos anti receptores CR3, inhiben la unión de gp63. Estos datos muestran la interacción directa que existe entre gp63 y CR3 cuando los componentes del complemento estan ausentes y no hay opsonización del parásito con C3. (Russell, 1989).

La otra molécula importante de la superficie de la leishmania es la Lipofosfoglicana (LPG), para L. major se vió que tienen el papel de aceptor para el tercer componente del complemento, el cual es convertido en C3b por la activación de la vía clásica del complemento. Por consecuencia los receptores CR1 unidos a C3b de macrófagos opsonizados, ocasionan la internalización del parásito. La entrada de L. mexicana al macrófago , puede ser mediada por la gp63, la cual se une a los receptores CR3 de las célula del huésped junto con la LPG. La LPG además es capaz de unirse a receptores parecidos a lectinas de los macrófagos. Es de gran importancia para la sobrevivencia de la leishmania utilizar el CR1, o el CR3, para introducirse a la célula huésped ya que no se produce el estallido oxidativo o lo hacen de manera poco agresiva para el parásito. (Turco,1990).

Se ha prestado mucha atención a existencia de receptores en los macrófagos afines con la leishmania, tanto en su estructura como en su función, debido a que se encuentran relacionados al reconocimiento y fagocitosis del parásito sin ser destruido (cuadro 1); sobretodo los receptores para complemento porque son los que participan de manera mas directa en la interacción del parásito con el macrófago, además de estar relacionados con la infectividad y el tropismo hacia ciertos tejidos.

Muchas especies de Leishmania pueden modificar su superficie para la adecuada fijación de complemento para unirse a CR1 y entonces ser endocitadas para producir un débil estallido oxidativo, el cual no será letal para el parásito y le permitirá sobrevivir dentro del macrófago. (Mosser, 1987).

Los promastigotes no infectivos pueden entrar al macrófago a través de otros receptores como el CR3, el cual reconoce a C3bi y activa la vía alterna del complemento y produce un fuerte estallido oxidativo, ocasionando la destrucción del parásito, pero aun no se conocen bien estos mecanismos (Russell, 1989).

CUADRO.1 PRINCIPALES RECEPTORES QUE PARTICIPAN EN LA RELACION LEISHMANIA-MACROFAGO (Russell, 1989)

RECEPTOR	LIGANDO
CR3	C3bi, gp63, fibrinógeno, LPS y LPG
PI50/95	C3bi, LPS, LPG
VLA5	Fibronectina
CR1	C3b/C3bi
Fc 1	IgG Monomérica
Fc 2	Complejos IgG
Manosa-fucosa	Oligosacáridos con manosa-fucosa-glucosamina

Una vez que se llevo a cabo el reconocimiento, el parásito es ingerido por los macrófagos mononucleares del huésped, transformandose en amastigotes aflagelados inmóviles. La sobrevivencia del parásito depende de la capacidad de este para transformarse a amastigote, ya que se ha demostrado que el promastigote es mas susceptible a la destrucción por los elementos líticos del fagolisosoma (Mauel, 1990).

La sobrevivencia del parásito en el fagolisosoma está dada por la presencia de moléculas de superficie que le confieren resistencia, por la producción de enzimas y otros productos que son excretados por el parásito y por la inhibición de metabolitos.

La severidad del estallido oxidativo depende del receptor utilizado, sobre todo de complemento, por la leishmania para entrar al macrófago y de la fase de crecimiento del parásito. La fase logarítmica de crecimiento induce un alto consumo de oxígeno en el macrófago, en cambio en la fase estacionaria (metacíclica) los amastigotes no permiten la producción de metabolitos oxidativos.

Los amastigotes pueden crecer al pH ácido de las vacuolas parasitóforas, además de neutralizar y degradar los productos tóxicos del macrófago, por la presencia de enzimas sumamente activas como la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y la catalasa. Además la LPG elimina a los radicales libres de oxígeno, previene la muerte del parásito por radicales hidroxilo y es capaz de inhibir a la β -galactosidasa lisosomal y a la proteína C Kinasa. (Bodgam, 1990).

También los macrófagos sintetizan y liberan fibronectina (Fn), con la cual pueden opsonizar a las leishmanias y facilitar la fagocitosis. El receptor de fibronectina (FnR) es de menor importancia porque no es específico para macrófagos y mas bien promueve activamente a los mediadores de la fagocitosis. Los mediadores de la fagocitosis como el receptor de manosa-fucosa

(MFR) y el receptor para Fc (FcR), frecuentemente ocasionan un fuerte estallido respiratorio y por lo tanto, la entrada del promastigote a través de estos receptores es muy desfavorable para la sobrevivencia del parásito. (Chang, 1990)

Para el caso de leishmania, los macrófagos presentan antígenos en el contexto de moléculas del MHC clase II a las células T que junto con la interleucina 1, permiten la activación de las células T. Los macrófagos infectados con *L. donovani*, son refractarios a la activación del interferón gama (IFN- γ). Cuando los macrófagos son infectados por *L. major*, se induce ampliamente la respuesta de las células T y un aumento importante de interleucina 1 (IL-1).

Se ha visto que *L. major* puede llevar al sistema inmune hacia la resistencia, o puede promover la enfermedad. En estudios de la respuesta inmune en ratones se ha demostrado que esto está mediado por linfocitos T CD4+ funcionalmente distintos, pero que difieren en la expresión de marcadores de superficie adicionales. Además hay diferencias en la concentración de sus linfocinas y la estimulación de cada población de linfocitos depende de la naturaleza del antígeno y de la manera como es presentado (Michell, 1985).

Los resultados de inmunizaciones experimentales usando diferentes formas de LPG, una con lípidos que puede inducir una respuesta protectora por células T y otra sin lípidos, la cual no produce protección.

Los linfocitos T de ratones susceptibles, como los Balb/c, producen altas cantidades de IL-3, comparativamente con los ratones resistentes como los C57/Bl.

Con la progresión de la enfermedad en los animales susceptibles, las células CD4+ del bazo disminuyen la producción de IL-2 y INF- β y la síntesis del RNAm para INF- γ . Por otro lado se incrementa el RNAm para IL-4 durante el curso de la enfermedad. Los linfocitos

T de ratones susceptibles aumentan significativamente la producción de IL-3 comparada con los animales resistentes.

En los animales resistentes la IL-2, el INF- γ y RNAM para INF-II aumentan, pero el RNAM para IL-4 disminuye.

Los linfocitos TH1 producen gran cantidad de INF- γ , pero no de IL-4 y los linfocitos TH2 producen preferentemente IL-4, pero no IFN- γ , pero ambos secretan IL-3 y GM-CSF, por lo que TH1 participa en la resistencia y TH2 en la susceptibilidad a la infección por Leishmania.

Parece que la falta de INF- γ en ratones susceptibles y en pacientes con leishmaniasis visceral es resultado de la activación inadecuada de los macrófagos, los cuales requieren de esta linfocina para la destrucción efectiva de los amastigotes.

El aumento relativo de IL-4 y GM-CSF también contribuye a la progresión de la enfermedad debido a que hay una regulación negativa en la producción de INF- γ y de IL-4.

CARACTERISTICAS Y COMPOSICION BIOQUIMICA DE LA SUPERFICIE CELULAR DE *Leishmania mexicana*.

Las evidencias bioquímicas indican que la mayoría de las células eucariotes tienen carbohidratos en la superficie de su membrana, los que tienen un importante papel en la estructura y la función de la célula, estos carbohidratos se encuentran asociados a péptidos, a proteínas y a lípidos formando glicosaminoglicanas.

Estudios realizados en *Leishmania donovani* han demostrado la presencia de varios carbohidratos polianiónicos en la superficie de su membrana en los diferentes estadios de desarrollo, como el glicosil-fosfatidil-inositol (GPIs) y mediante el uso de lectinas se ha demostrado la presencia de ligandos unidos a la superficie de la membrana en configuraciones en α -1,4 y α -1,6 (Dweyer ,1977 y Dawidowicz, 1975).

El mayor glicoconjugado de la superficie de *Leishmania* es una lipofosfoglicana (LPG), o también llamado Factor Excretor (FE), o lipopolisacárido (LPS). Es relativamente abundante, se estima que existen más de un millón de moléculas en la superficie de los promastigotes de *L. donovani*, *L. major* y en *L. mexicana* ocupando cerca del 25% de la superficie total de la célula. La LPG presenta diferencias estructurales de acuerdo a la fase de desarrollo de la *Leishmania*, las que abordaran posteriormente, (Sack, 1992 y Turco, 1990).

La LPG también se han encontrado en la superficie celular de macrófagos infectados de leishmanias, a partir de las primeras 6 horas post-infección (Williams, 1986).

La LPG o Factor Excretor esta relacionado con la superficie del promastigote además puede ser excretado al medio de cultivo. Esta liberación al medio puede ocurrir en 2 formas estructuralmente

distintas, una unida fuertemente a la albúmina sérica del medio, la cual se piensa esta interactuando con la parte hidrofóbica de la albúmina. La otra es una forma hidrofílica, (Turco, 1988), que es similar a la LPG celular.

La LPG es una molécula altamente polimórfica y varía de acuerdo a la especie y cepa de la que se trate, su peso oscila entre 5 a 9 kDa. La estructura inicial propuesta por Turco (1988), para la LPG de *L. donovani* y detallada por Thomas (1992), tiene un peso molecular aproximado de 9 kDa, la cual consiste en un núcleo heptasacárido fosforilado, común para todas las especies de *Leishmania*, un lípido (lisoalkil-fosfatidil-inositol) (Turco, 1989b), con una cadena alifática de C24 o C26 saturados, que también es común para todas las especies y un oligosacárido de 16 unidades repetitivas característico de la especie, el cual se encuentra fosforilado y tiene un corazón fosforilado común para todas las especies. En esta región sacarídica se encuentra en su parte terminal formando un oligosacárido neutro a manera de cubierta (CAP) que también es especie específico formado por 2 disacáridos y 3 trisacáridos, aunque no se conoce la estructura exacta de la LPG de esta especie (figura 1).

En cambio la estructura propuesta por Mc Conville (1990), para *L. major* es una fosfoglicana con 27 unidades repetitivas con 8 diferentes tipos de tri y tetrasacáridos fosforilados, pero aun no se conoce la estructura exacta. El CAP está formado por el disacárido neutro Manp (α 1-2) Manp α 1- (figura 2).

La estructura de *L. mexicana* propuesta por Ilg (1992), presenta 20 unidades de repetición de oligosacáridos específicos de la especie en la LPG unida a la superficie del promastigote y 28 unidades en la LPG libre en el cultivo. Al igual que las otras 2 LPGs, consta de su núcleo heptasacárido, la parte lipídica (lisoalkil-fosfatidil-inositol) y el CAP. En esta especie el CAP también es rico en manosas, pero solo presenta 1 disacárido y 2

FIG. 1

ESTRUCTURA DE LA LPG DE *Leishmania donovani*

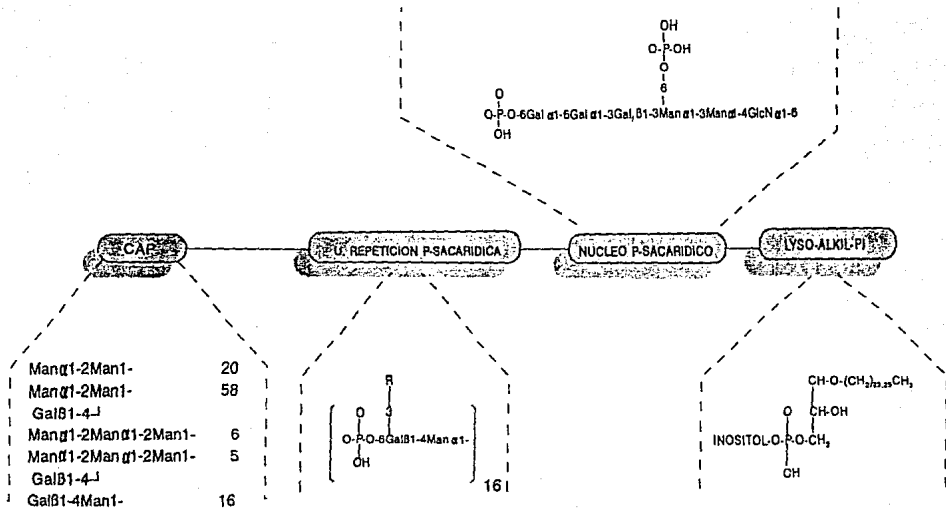


FIG. 2 ESTRUCTURA DE LA LPG DE Leishmania
 major

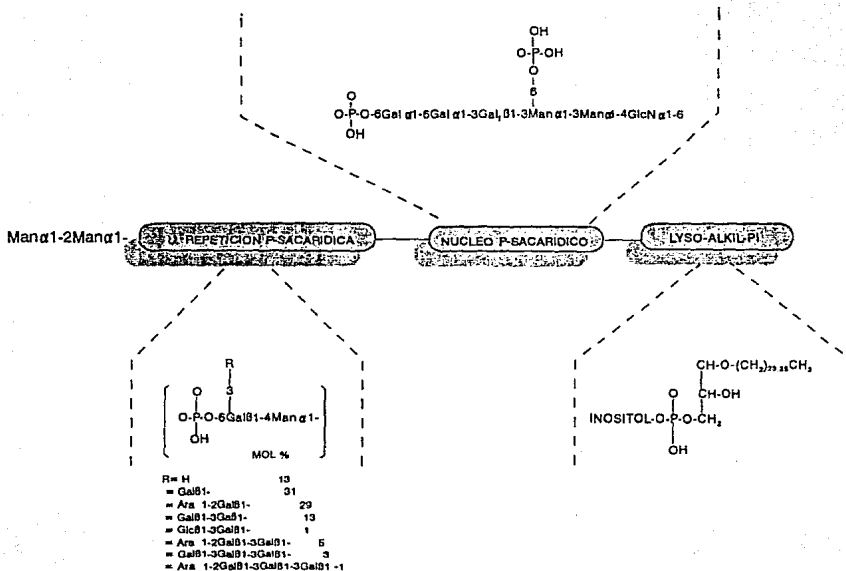
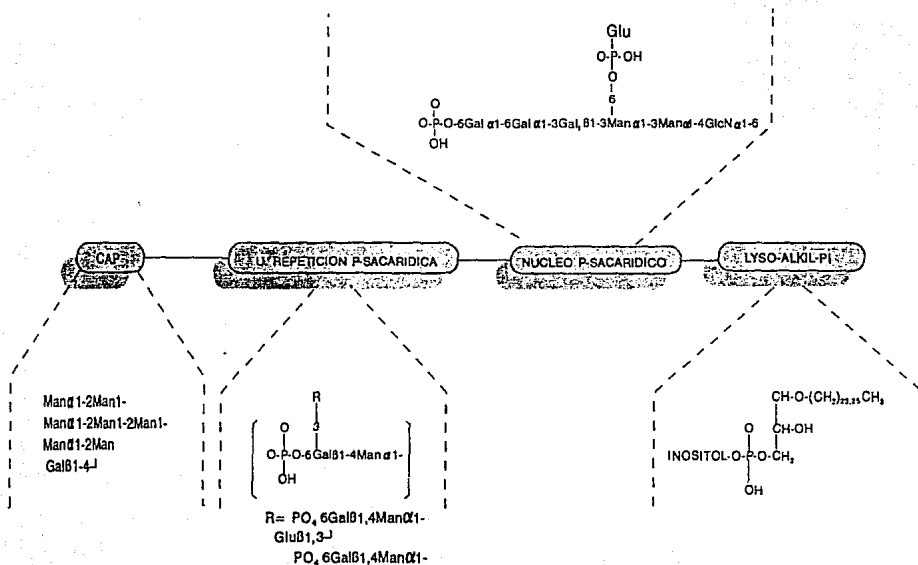


FIG. 3 ESTRUCTURA DE LA LPG DE *Leishmania mexicana*



trisacáridos (figura 3).

La parte lipídica de la LPG es similar al fosfatidil inositol unido a carbohidratos que ha sido reportado para un gran número de proteínas en membranas de eucariotes, pero la LPG es el primer caso de un lípido de este tipo unido a un polisacárido. La principal diferencia estructural consiste en que los 2 lípidos están anclados a un fosfatidil-inositol (PI) convencional diacilados para la proteína y un liso-alkyl PI para la LPG. Las Leishmanias pueden ser los primeros organismos reportados que pueden usar diferentes glicolípidos para anclarse a 2 distintas superficies de macromoléculas (LPG y la proteasa de superficie de promastigotes conocida como GP63), (Chang, 1990).

La inusual estructura de la LPG puede dar lugar a las propiedades altamente antigénicas, además la gran diversidad en las unidades de repetición sacarídicas de la molécula, de acuerdo a la especie y cepa de la que se trate, da por resultado una gran diversidad antigénica.

La heterogeneidad antigénica probablemente sea mas importante para otro grupo de moléculas relacionado con la superficie de membrana, como los glicolípidos inositol (GIPs), los cuales están compuestos por unidades de azúcar de dimensiones variables similares a la LPG, pero están ancladas a la membrana por cualquier alquil-alcil-glicerol o liso-alkil-glicerol.

Los GIPs son antigénicamente diferentes, no obstante pueden ser precursores de LPG y de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), o de lípidos anclados a ciertas glicoproteínas de membrana como la gp63, que es una metaloproteína asociada con la actividad proteolítica (Chang, 1990).

Estudios funcionales paralelos al análisis estructural han demostrado que la LPG juega un papel importante en la interacción

y supervivencia de la *Leishmania* dentro del macrófago (Handman, 1986).

Las evidencias experimentales sugieren que la LPG se combina con los radicales libres del oxígeno; inhibe a enzimas relevantes como las glicosidasas lisosomales y la proteína C Kinasa (Mc Neely, 1987) así como la inhibición de enzimas digestivas del mosquito vector . Otra de las acciones biológicas propuestas es la inhibición de la respuesta linfoproliferativa (Chang, 1990).

Las proteasas tienen importantes papeles biológicos, como el asociado a la virulencia de los microorganismos. Recientemente se han encontrado en células eucariotas una gran variedad de esas enzimas, (Mc.Kerrow J., 1988). La caracterización bioquímica de estas moléculas es interesante, para comprender su posible papel biológico en las infecciones .

Asociada con la actividad proteolítica, se ha reportado la presencia de una glicoproteína de membrana de 63 kDa en el género *Leishmania*, llamada gp63. Está molécula se encuentra en la superficie de parásitos en las especies más patógenas en ambos estadios de desarrollo, (Chaudhvir, 1989). Se estima que constituye cerca del 1 % de las proteínas de la superficie de la célula, con aproximadamente 500,000 copias por célula y tiene actividad de proteasa a un pH alcalino de 4.

La gp63 fue reconocida inicialmente como la glicoproteína más antigénica de *Leishmania mexicana amazonensis* (Chang, K.P. 1983). La gp63 de *L. m. amazonensis* fue purificada con anticuerpos monoclonales y se encontró que tiene actividad proteolítica contra algunas proteínas nativas a pH superior a 4. Esto es de gran relevancia para la *Leishmania* como parásito del compartimento ácido del fagolisosoma del macrófago. (Chaudhvir 1989).

Aun no se conoce el papel de esta molécula en la virulencia del

parásito. La gp63 de *L. mexicana* purificada en ambos estadios con anticuerpos mono y policlonales indican que :

- La gp63, es una metaloproteínasa ácida, posiblemente con Zn (II) en su sitio activo.
- Esta presente en ambos estadios del desarrollo del parásito, con cambios moleculares durante la evolución de este.
- La actividad bioquímica que tiene es de una proteínasa (Chaudhvir, 1989).

UTILIZACION DE LAS LECTINAS COMO UNA HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACION DE LA LPG.

Recientemente se han realizado trabajos utilizando lectinas como herramientas para la identificación de los polisacáridos de superficie de la membrana de los promastigote mediante aglutinación con lectinas específicas y por medios histoquímicos (Dwyer, 1974).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que poseen la capacidad de reconocer específicamente estructuras que contienen carbohidratos y de aglutinar diversas células, así como de precipitar glicoconjugados. Estas moléculas poseen por lo menos dos sitios de enlace que se unen a residuos carbohidratos de manera no covalente y sin provocar ninguna modificación a su estructura primaria. En el reconocimiento participan las cargas de superficie, el anomerismo de los azúcares (alfa o beta) y el reconocimiento y la localización de uno o mas residuos de azúcares en las cadenas de carbohidratos.

Estas moléculas fueron descritas a finales del siglo pasado y hasta la fecha se han identificado un gran número de ellas, provenientes tanto de plantas, como de animales, bacterias entre otros organismos.

Se han utilizados técnicas de inhibición con diversas estructuras con carbohidratos para su identificación y determinación de su especificidad o bien mediante la precipitación de glicoconjugados.

Por la capacidad de reconocer específicamente a estructuras sacarídicas, se ha utilizado ampliamente a las lectinas para aislar glicoproteínas y polisacáridos y reconocer azúcares de la superficie de numerosas células (Lis, 1986).

La lectina de Con A tiene una elevada afinidad por una estructura bicatenaria constituida por un centro trimanosídico sustituido por 2 residuos de N-acetil-D-glucosamina y la lectina de lenteja reconoce con elevada afinidad a una estructura bicatenaria del tipo N-acetilactosamínico con residuos de galactosa en una posición terminal no reductora, su unión aumenta considerablemente si se encuentra unido a un residuo de fucosa por enlaces $\alpha(1-6)$ en la GlcNac que se encuentra unida a la Asparagina (figura 4), (Debray, 1981).

FIGURA 4. ESTRUCTURAS GLICOSIDICAS RECONOCIDAS POR LAS LECTINAS DE CON A Y LENTEJA

CON A

β -GlcNac-(1-2)- α -Man-(1-3)

|
 β -Man-(1-4)- β GlcNac-(1-4)- β -GlcNac-Asn

|
 β -Glc-(1-2)- α -Man-(1-6)

LENTEJA

β -Gal-(1-4)- β GlcNac-(1-2)- α -Man-(1-3)

ASN
|
 β -Man-(1-4)- β -GlcNac-(1-4)- β -GlcNac
|
 α (1-6)-FUC

|
 β -Gal-(1-4)- β -GlcNac-(1-2)- α -Man-(1-6)

O B J E T I V O S

- 1) Aislar y caracterizar parcialmente al Factor Excretor o Lipofosfoglicana (LPG) de *Leishmania mexicana mexicana* de varias cepas aisladas en México con diferentes características clínicas, purificadas cromatografía de afinidad con lectinas.
- 2) Determinar alguna actividad biológica de las fracciones del Factor Excretor purificadas.
- 3) Determinar la utilidad de las lectinas Con A y de lenteja como herramienta para aislar e identificar las diferentes cepas de *Leishmania* existentes en México.

H I P O T E S I S

Se ha demostrado que existen notables diferencias en la composición sacarídica y en la estructura del Factor Excretor, que son moléculas de lipofosfoglicanas o LPG de la superficie del parásito, en diferentes especies y fases de desarrollo del género *Leishmania*, se supone entonces que debe existir tales diferencias aun entre cepas de la misma especie.

Si la LPG es una molécula que interviene en la penetración y sobrevivencia de la *Leishmania* dentro del macrófago además de estar relacionada con su virulencia, entonces debe haber diferencias en la evolución la enfermedad en ratones susceptibles si son inmunizados previamente con la LPG.

J U S T I F I C A C I O N D E L T R A B A J O

Se han reportado numerosos casos en México de leishmaniasis cutánea que en ocasiones se diseminan o que curan espontáneamente, siendo que el agente etiológico identificado es el mismo.

Esto hace suponer que existen diversas cepas, varias de las cuales ya han sido caracterizadas parcialmente de acuerdo a la evolución de la enfermedad, por medio de isoenzimas y por hibridación de DNA, pero aun no se han determinado las diferencias bioquímicas ni moleculares que existen entre ellas.

En este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de estas características, además de sentar las bases para estudios subsecuentes que permitirán determinar la estructura primaria y la conformación de moléculas que aparentemente tienen un papel relevante en la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago y que le confiere virulencia, como es el caso de la lipofosfoglicana de la superficie de la membrana del parásito, también llamada Factor Excretor o LPG.

Se pretende además establecer una metodología para la identificación y purificación de fracciones de la LPG que pudieran utilizarse como antígenos puros para inducir una verdadera protección contra el parásito.

M A T E R I A L Y M E T O D O

1. CULTIVO DE LEISHMANIA

Se trabajó con 4 cepas de *Leishmania mexicana mexicana*, de las cuales la cepa Gustavo Solís (LCD) fué aislada en el laboratorio de Inmunobiología de los Parásitos, del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por la Dra. Amalia Monroy a partir de un paciente con leishmaniasis diseminada proveniente de Cárdenas, Tabasco. Las cepas Heriberto Frías (H.F.) y Soberano fueron donadas por el Instituto Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (INDRE). Finalmente la cepa Yucatán, fué donada por el Dr. Fernando Andrade de la Universidad Autónoma de Yucatán. Todas fueron tipificadas en el laboratorio de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la Medicine Tropical and Hygiene School por el Dr. J. Evans.

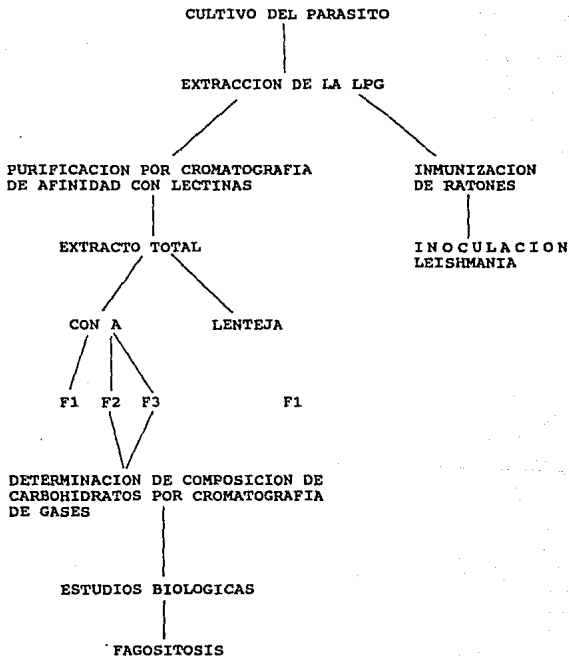
CUADRO 2. CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE LEISHMANIA MEXICANA MEXICANA UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

CEPA	CLAVE OMS	CARACTERISTICAS
Yucatán (YUC)	MHOM/MX/83/UAVCV	Cutánea, localizada, sin cura espontánea, aislada de un paciente de Quintana Roo
HERIBERTO FRIAS (H.F.)	MHOM/MX/84/ISETHF	Cutánea, localizada, aislada de un paciente de Veracruz
Gustavo Solís (LCD)	MHOM/MX/84/ISETGS	Cutánea, diseminada con cura espontánea, aislada de un paciente de Cárdenas Tabasco
Soberano (SOB)	MHOM/MX/88/HRCJS	Cutánea, localizada, sin cura espontánea, aislada de un paciente de Cárdenas, Tabasco.

Los parásitos fueron mantenidos en el laboratorio en ratones Balb/C y C57BL inoculados en el cojinete plantar izquierdo y en cultivos con medio RPMI con 10 % de suero fetal de ternera (Sigma Chem, USA) y el medio bifásico de Seneckji. Para este trabajo unicamente se utilizó el medio RPMI complementado con suero fetal:

100 ml de RPMI (Sigma Chem,USA)
 Suero Fetal de bovino al 10% (In Vitro)
 2 ml de NaCO3 al 7.5% (J.T. Baker)
 1 ml estreptomocina-penicilina (100 µg/ml)
 ajustando el pH a 7 con HCl

FIGURA 5. ESQUEMA DE TRABAJO



La curva de crecimiento para cada una de las cepas se realizó en tubos de cultivo con 5 ml de medio RPMI inoculándose 1×10^6 promastigotes y se incubaron a temperatura ambiente. Se realizó la cuantificación de los parásitos en cámaras de Neubauer cada tercer día para determinar las fases de crecimiento. (García, 1993 y Fuentes, 1993).

Para cada cepa se inocularon de 6 a 8 frascos de 500 ml de medio RPMI con promastigotes para obtener un gran volumen de material para purificar la LPG. Estos se incubaron a temperatura ambiente de 7 a 10 días para posteriormente purificar el Factor Excretor.

2.- EXTRACCION DE LA LIPOFOSFOGLICANA (LPG)

A partir de los cultivos de RPMI con 7 a 10 días de crecimiento, a temperatura ambiente, equivalente a la fase estacionaria del crecimiento del parásito y con una concentración del parásito de aproximadamente 6×10^6 promastigotes/ml, se procedió a extraer la lípofosfoglicana (LPG), según la metodología propuesta por Slutzky G., (1979), para esto se usaron de 3 a 4 litros de medio para su procesamiento.

PROCEDIMIENTO

- a) Se centrifugó el medio de cultivo a 3000 rpm durante 15 minutos para separar los parásitos y el material particulado del medio.
- b) Se centrifugó nuevamente el medio a 5000 rpm durante 30 minutos, para eliminar todos los residuos celulares del medio.

- c) Se filtró el sobrenadante del medio con una membrana Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ para eliminar partículas.
- d) El material filtrado se calentó a baño María a 70°C y se le agregó Ac. acético glacial al 10 % hasta alcanzar un pH aproximado de 5, y se continuó calentando 30 min hasta que se precipitaron las proteínas.
- e) Las proteínas precipitadas se eliminaron mediante centrifugación a una velocidad de 5000 rpm durante 15 minutos.
- f) El medio se concentró por liofilización.
- g) El medio concentrado se dializó exhaustivamente contra agua destilada usando una membrana Spectrapor con poro de 6,000 a 8,000 Da, durante 48 hr, con un recambio del agua cada 12 hr.
- h) Las proteínas restantes se eliminarán agregando al medio concentrado una solución de fenol : preparada con 150 g de fenol en 100 ml de agua destilada calentada a 70°C y manteniéndola a esa temperatura en Baño María, se homogeneizó perfectamente la mezcla y posteriormente esa solución se centrifugó a 15 000 rpm durante 10 minutos, esto se repitió 4 a 5 veces o hasta que ya no quedarán mas residuos de proteínas.
- i) La purificación de la LPG se realizó por cromatografía de filtración en una columna de $150 \times 2.5 \text{ cm}$ con Sephacryl S-100, equilibrada y eluida con solución salina 0.86 % con una velocidad de flujo de 18 ml/hora con un volumen total de 200 ml, colectando fracciones de 3 ml cada una.
- j) Se determinó el patrón de elución de las fracciones

espectrofotómetro Beckman DU 70.

k) Las fracciones que mostraron una densidad óptica mayor de 1.00 nm se colectaron. Finalmente el material purificado se concentró por liofilización y se resuspendió en un volumen de 5 ml de solución salina 0.86 %.

l) Se determinó la presencia de las moléculas con dominancia antigénica del eluido mediante una inmunodifusión doble (Oüchterlony) utilizando suero hiperinmune de conejo, inmunizado con una mezcla de las 4 cepas de *Leishmania mexicana* bajo el esquema del cuadro 5. (manual de prácticas de inmunología. Depto Inmunología. ENCB, IPN)

CUADRO 3. ESQUEMA DE INMUNIZACION DE CONEJOS CON LEISHMANIA MEXICANA *

INMUNIZACION	TIEMPO días	DOSIS ml	VIA
1	0	0.25	I.V.
2	4	0.50	I.V.
3	8	1.0	I.V.
4	12	1.5	I.V.

* 300 millones de promastigotes / ml

m) Se cuantificarán los carbohidratos usando la técnica del Orcinol y ac. sulfúrico (Remington, 1940).

Se utilizó una solución de Orcinol (Sigma) de 1.5 g en 100 ml de H₂SO₄ al 30 %.

- Se colocaron 0.2 ml de la sol. de Orcinol, 1.5 ml de H_2SO_4 al 60 % y 100 μ l de la muestra, calentandose a 80° C por 20 minutos y enfriando 45 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se determinó la absorbancia de las muestras a 420 nm.

3.- PURIFICACION DE LA LPG POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD UTILIZANDO LECTINAS

- Se utilizaron 2 columnas de cromatografía de 1.5 x 10 cm de Mini-Leak (agarosa) Kem-En-Tec, Copenhage, Dinamarca, activada con divinilsulfonato. Estas se acoplaron con 400 mg de lectinas de Canavalina (Con A) y de Lens culinaris (lenteja), ambas obtenidas de Pharmacia Chemical, Suecia.
- Se colocaron 100 μ l de LPG total de cada cepa en las columnas de cromatografía con Con A y lenteja.
- La fracción no retenidas (F I) fué eluida con solución salina (NaCl) 0.86 % y una fracción retenidas (F II), la que fué eluida de la columna con Metil- α -D Manopiranosido (α -MM) 0.2M (Sigma) y una fracción mas, fué obtenida por la adición de CH_2COOH al 3% (FIII).
- Se realizó un espectro de absorbancia y se determinó el patrón de elución para los componentes aislados mediante la medición de la densidad óptica a 215 nm de cada fracción.
- Se dializaron exhaustivamente cada una de las fracciones obtenidas en agua destilada para eliminar las sales, el manósido o el ácido acético, para posteriormente liofilizarlas y resuspenderlas con agua destilada.

- Se les determinó la presencia de epitopes inmunodominates de las fracciones por medio de una inmunodifusión doble (Oüchterlony) con suero de conejo hiperinmune.

4.-COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

- A cada una de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad con lectinas se les determinó la composición de carbohidratos, hidrolizando cada fracción con metanol /HCl 0.5 M a 100^o C por 24 horas, provocando la formación de alditoles, los cuales se trifluoroacetilaron mediante la adición de piridina y ácido trifluoroacético, (Montreuil J., 1986) y (Zanneta, 1972). Estas determinaciones fueron realizadas en el laboratorio de Química Biológica de la Universidad de Ciencias y Técnicas de Lille. Villanueva d'Ascq. Francia.

5.- CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LA LPG

a) Inoculación de animales

- Se utilizaron ratones singénicos de la cepa Balb/c hembras, de 45 días de edad obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, se hicieron 6 grupos de 10 animales y se les inmunizó con la LPG de la cepa Soberano, a una concentración por ratón de 4.5 µg/ml ajustada en un volumen final 0.4 ml por animal, siguiendo el esquema de vias de inoculación propuesto en el trabajo de J. Alexander y Rusell,1989 (cuadro 4).

CUADRO 4. ESQUEMA DE INMUNIZACION DE RATONES BALB/C CON LA LPG

Grupo 1	Inmunización con LPG por vía intraperitoneal
Grupo 2	Inmunización con LPG por vía subcutánea (cojinete plantar izquierdo)
Grupo 3	Inmunización con LPG por vía subcutánea mas adyuvante completo de Freund 1:1 (v/v)
Grupo 4	Inoculado con adyuvante completo de Freund por vía subcutánea.
Grupo 5	Testigos infectados con Leishmania subcutáneamente en cojinete plantar izquierdo.
Grupo 6	Testigo inoculado únicamente con 0.4 ml de PBS en el cojinete plantar izquierdo

Se hizo una reimmunización a los 30 días con el mismo esquema y finalmente 60 días después se procedió a infectarlos con promastigotes en fase estacionaria (cultivo de 10 días de crecimiento de Leishmania mexicana mexicana cepa Soberano, inoculando 5 millones de promastigotes resuspendidos en PBS en el cojinete plantar derecho de cada ratón (Rivas, 1990).

Se observó la evolución de la infección durante 3 meses, evaluando y midiendo el diámetro de la lesiones con un bernier cada 15 días.

Se sacrificaron los animales a las 12 semanas y se realizaron observaciones histopatológicas de las lesiones de las patas, fijandolas con formaldeido al 10 % y se utilizaron técnicas histológicas convencionales. A los cortes se les realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina.

5.2. EFECTO DE LA LPG SOBRE LA FAGOCITOSIS

- Se utilizaron ratones hembras Balb/c de 45 días de edad, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.
- Se obtuvieron los macrófagos de cavidad peritoneal en condiciones estériles, extrayéndose con PBS estéril con heparina al 0.1 %, posteriormente se lavaron y se resuspendieron en 5 ml de medio RPMI con suero fetal de bovino (Sigma Chem) al 10 %, adicionado con 1 ml de glutamina.
- Se colocaron 500 macrófagos por pozo en placas de cultivo de 24 pozos para células a los que se les había colocado previamente cubreobjetos esteriles cortados al tamaño de los pozos.
- Se dejaron adherir durante 2 Hr. y posteriormente se lavaron para agregar la LPG y 10 000 eritrocitos de carnero resuspendidos en 300 µl de PBS, obtenidos del Rancho de Topilejo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, siguiendo el esquema del cuadro 5, para cada una de las fracciones y para la LPG total.

CUADRO 5. ESQUEMA DE INCUBACION DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES BALB/C CON LPG.

1	4 µg/ml de LPG
2	2 µg/ml de LPG
3	0.8 µg/ml de LPG
4	0.4 µg/ml de LPG
5	0.2 µg/ml de LPG
6	0.004 µg/ml de LPG
7	0.0004 µg/ml de LPG
8	2 µg/ml de LPG + ÓMM(0.2M)
9	0.4 µg/ml de LPG + ÓMM(0.2M)
10	Testigo 1 ÓMM(0.2M)
11	Testigo 2 RPMI

* Estos ensayos se realizarón por triplicado

- Los macrófagos con la LPG y los eritrocitos se incubaron 1 hr a 37°C con atmósfera de CO₂ y finalmente se lavaron de 4 a 5 veces con PBS para eliminar los eritrocitos y se procedió a fijar con metanol absoluto durante 5 minutos y a teñir con Giemsa 1:20 durante 20 minutos.
- Se revisaron 4 campos a 100x, contandose en cada 100 macrófagos los eritrocitos dentro de cada macrófago, los resultados se expresan como índice fagocítico que es el número de eritrocitos por macrófago x 100.

RESULTADOS

I. CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS PARASITOS

Todas las cepas de *Leishmania* utilizadas tienen un crecimiento logarítmico que comprende hasta el 7o. día en promedio presentandose una fase estacionaria que abarca del 7o. al 10o. día en promedio. Finalmente el parásito empieza a perder movilidad, alterar su morfología y finalmente morir después del 14 o. día.

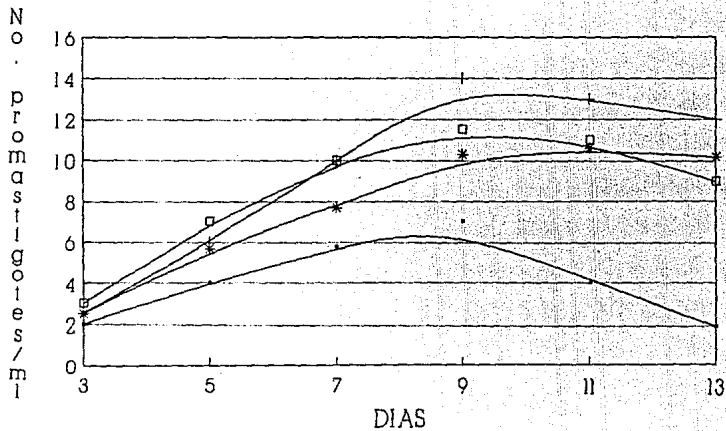
La cepa Yucatán presenta mayor número de promastigotes /ml en la fase estacionaria con 14×10^6 , siguiendole la cepa LCD con 11×10^6 promastigotes/ml, la cepa H.F con 9×10^6 promastigotes/ml y finalmente la cepa Soberano con 6×10^6 promastigotes/ml. (García, 1993 y Fuentes, 1993). (Figura 6). Estos datos muestran que los promastigotes de las cepas Yucatán y LCD tienen la capacidad de reproducirse más rápidamente en cultivo que las otras 2 cepas, por lo que el rendimiento del cultivo para la obtención de LPG es mayor. Sin embargo la obtención de la LPG para las 4 cepas se realizó en el día 10.

II. PURIFICACION DE LA LPG.

II.a) OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LPG DE LEISHMANIA

Las diferentes cepas de *Leishmania mexicana* que se utilizaron para este trabajo fueron aisladas directamente de pacientes con leishmaniasis de diferentes localidades de la República Mexicana, y tipificadas en el laboratorio del Dr. Evans en el Medicine

CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS 4 CEPAS DE *L. mexicana*



— SOB + YUC * H.F. □ LCD

FIGURA 6

Tropical and Hygiene School, Londres, mediante la identificación de la actividad de diversas isoenzimas e hibridización de DNA.

Cada una de las cepas han sido conservadas en el laboratorio en cultivo en medio RPMI suplementado con suero fetal de ternera al 10 % y en el medio bifásico de Seneckji y frecuentemente inoculando ratones para conservar la virulencia de las cepas.

Se utilizó en este trabajo la Lipofosfoglicana (LPG) de promastigotes en fase de crecimiento estacionario correspondiente al día 7 al 10.

La técnica de extracción de la LPG se realizó según el protocolo propuesto por Slutzky, (1979), que permite la desnaturalización de las proteínas mediante cambio de pH con ac. acético, calentamiento a 70°C y posteriormente la utilización de fenol.

Con esta técnica se pudo obtener por cada 6 x 10⁶ promastigotes por ml. en cultivo concentraciones de carbohidratos que oscilan de los 50 a los 100 µg/ml (cuadro 6).

En el proceso de aislamiento del Factor Excretor en primer lugar se dializó exhaustivamente cada una de los extractos de las cepas trabajadas con una membrana de diálisis de nitrocelulosa con un límite de corte entre 6 a 8 kDa y posteriormente por cromatografía de filtración en una columna con Sephacryl S-100 cuyo volumen de exclusión fué previamente calculado mediante la aplicación de diversas proteínas con pesos moleculares conocidos como; albúmina sérica bovina, con P.M. de 68 000 ; citocromo C, con un P.M. de 12 400 y mioglobina con un P.M. de 18 000.

Como se presenta en el cuadro 6 la mayor concentración de LPG determinada por contenido de carbohidratos totales mediante la técnica del Orcinol, (Remington, 1940) fue obtenida en un volumen de exclusión de aproximadamente 100 ml. Como puede observarse de

acuerdo a la absorbancia a 280 nm que es la indicada para la lectura de proteínas, no se encuentra material proteico en de las fracciones colectadas. (figura 7).

Finalmente a cada una de las fracciones colectadas se les realizó una inmunodifusión doble (Oüchterlony) en placas de agarosa y suero hiperimmune de conejo, para determinar en cual fracción se encontraba la LPG, obteniendose siempre entre las fracciones comprendidas entre los 105-111 ml de un total de 200 ml eluidos, por lo que de acuerdo a los marcadores de peso molecular que se utilizaron, la LPG tiene un peso molecular aproximado de 10 kDa. para todas las cepas estudiadas.

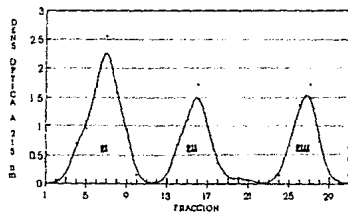
CUADRO 6 . CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE LA LPG DE LAS 4 CEPAS ESTUDIADAS (Tec. Orcinol)

CEPA	CONCENTRACION
LCD	99.38 µg/ml
YUC	75.27 µg/ml
SOB	55.17 µg/ml
H.F.	51.35 µg/ml

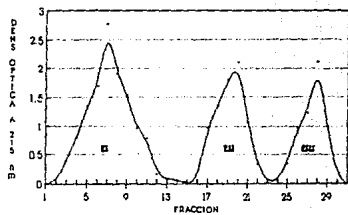
II.b) PURIFICACION DEL FACTOR EXCRETOR O LPG POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON LECTINAS

La LPG de cada una de las cepa fué purificada por cromatografía de afinidad usando una columna de agarosa conteniendo la lectina de Canavalia ensiformis (Con A) y por otro lado una columna acoplada con lectina de Lens culinaris (lenteja).

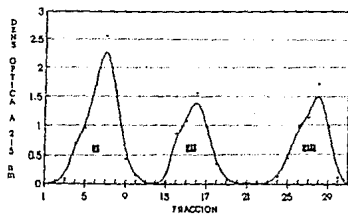
PATRON DE ELUCION DE LPG DE L. MEXICANA
CEPA SOBERANO PURIFICADA CON CON A



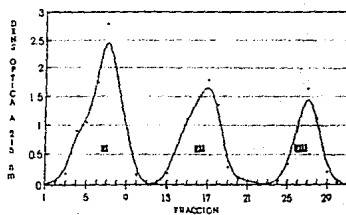
PATRON DE ELUCION DE LPG DE L. MEXICANA
CEPA LCD PURIFICADA CON CON A



PATRON DE ELUCION DE LPG DE L. MEXICANA
CEPA YUCAZAN PURIFICADA CON CON A



PATRON DE ELUCION DE LPG DE L. MEXICANA
CEPA HF. PURIFICADA CON CON A



con lectina de *Lens culinaris* (lenteja).

De acuerdo al perfil de elución presentadas para cada cepa para Con A, se purificaron 3 fracciones, la primera fracción corresponde al material no retenido (F I), que contiene hasta el 50 % del material aplicado a la columna, la segunda corresponde al material con gran afinidad por la lectina y que fue retenido por la columna (F II), el cual fue eluido mediante la adición a la columna de α Metil- Manósido 0.2 M y finalmente una tercera fracción la cual fué recuperada mediante la adición de Ac. acético al 3 %. Como se puede observar en la figura 8 el perfil de elución para cada una de las cepas fué muy similar. En cambio para el caso de la lectina de lenteja no se pudo aislar ninguna fracción, ya que todo el extracto de la LPG que se agregó no fué retenido ni reconocido por la lectina.

Cada fracción purificada por cromatografía de afinidad con Con A fué liofilizada para posteriormente determinar la concentración de carbohidratos por la técnica del orcinol-ac. sulfúrico. Como se aprecia en el cuadro 7 el proceso de purificación de las diferentes LPGs por cromatografía de afinidad permite una recuperación del material aplicado a cada columna superior al 80 % en cada caso. La lectina de *Lens culinaris* no posee la capacidad de retener la LPG y practicamente todo el material aplicado a la columna es recuperado con todas sus características antigénicas en la fracción no retenida por la columna (F I), como lo revela la inmunodifusión (cuadro 8).

CUADRO 7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION * DE CARBOHIDRATOS DE CADA FRACCION PURIFICADA CON LECTINAS DE CON A Y LENTEJA

CEPA	TOTAL	FI		FII	FIII
		CON A	LENT	CON A	CON A
LCD	99.38	43.10	95.53	32.02	24.26
YUC	98.27	43.40	92.98	12.87	29.00
SOB	98.17	49.92	93.20	34.77	10.48
H.F.	97.35	45.53	94.52	32.13	13.69

* valores reportados en $\mu\text{g/ml}$

Se observó la presencia de determinantes antigénicos en las fracciones F II purificadas en la columna de Con A para todas las cepas, los cuales pueden ser comunes ya que fueron reconocidos por el suero hiperinmune en la inmunodifusión y que tienen identidad total (Cuadro 8). Es interesante el hecho de que las fracciones F I y F III para cada una de las cepas estudiadas no es reconocido por los anticuerpos excepto para las cepas de *L. mexicana* Soberano y H.F.

CUADRO 8. RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS DE CONEJO a LPG DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS CON LECTINAS

CEPA	TOTAL	F I		FII		F III	
		Con A	Lent	Con A	Lent	Con A	Lent
SOB	+	-	+	+	-	+	-
LCD	+	-	+	+	-	-	-
YUC	+	-	+	+	-	-	-
H.P.	+	-	+	+	-	+	-

FIGURA 9. INMUNODIFUSION DE LAS FRACCIONES DE LA LPG



II.c) COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS

Las composición de carbohidratos de la LPG determinados por cromatografía de gases muestran importantes diferencias en cuanto a la composición de carbohidratos entre cada una de las fracciones purificadas con Con A y también hay grandes diferencias entre las 4 cepas entre si. (figura 10, 11, 12 y 13, cuadros 9, 10, 11 y 12).

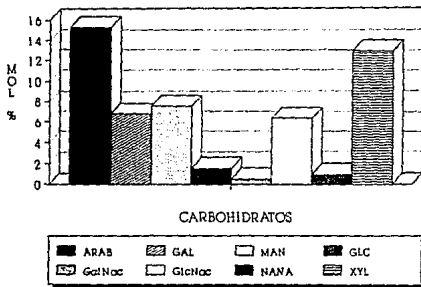
CUADRO 9. COMPOSICION SACARIDICA DE LA CEPA SOBERANO PURIFICADA CON CON A

Carbohidrato	Ext.Total	F II	F III
Arabinosa	15.3	1.19	33.0
Galactosa	6.8	7.7	4.9
Manosa	7.6	46.0	18.7
GalNac	0.5	-	-
GlcNac	6.4	1.2	1.2
Glucosa	1.5	0.8	2.5
NaNa*	0.9	-	-
Xilosa	13.0	-	-

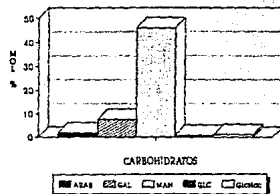
* Determinado como ácido N-acetil-Neuramínico.
valores expresados en Mol % considerando un P.M. de 10 kDa.

FIGURA NO 9

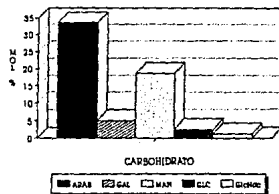
COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG DE L.MEXICANA CEPA SOBERANO EXT. TOTAL



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG DE L.MEXICANA CEPA SOBERANO F II CON A



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG DE L.MEXICANA CEPA SOBERANO F III CON A



CUADRO 10. COMPOSICION SACARIDICA DE LA CEPA YUCATAN PURIFICADA CON CON A

Carbohidrato	Ext.Total	F II	F III
Arabinosa	9.7	5.1	1.2
Galactosa	4.6	7.0	21.0
Manosa	34.7	32.3	25.3
Glucosa	3.4	8.6	8.0
GlcNac	1.6	3.2	0.4
Xilosa	2.0	-	-

* valores expresado en Mol % considerando un P.M. de 10 kDa.

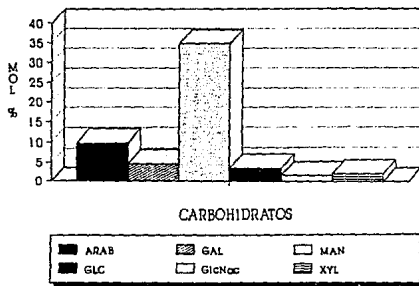
CUADRO 11. COMPOSICION SACARIDICA DE LA CEPA H.F PURIFICADA CON CON A.

Carbohidrato	Ext.Total	F II	F III
Arabinosa	0.3	1.8	5.6
Galactosa	6.5	1.0	22.5
Manosa	25.0	45.51	28.2
Glucosa	6.0	1.3	1.1
GalNac	5.0	-	-
GlcNac	10.2	6.1	-

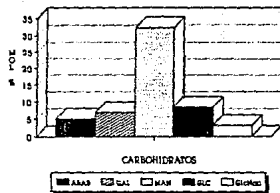
valores expresados en Mol % considrando un P.M. de 10 kDa.

FIGURA NO. 10

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG DE L. MEXICANA CEPA YUCATAN EXTRAC.TOTAL



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG CEPA YUCATAN F II CON A.



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG CEPA YUCATAN F III CON A.

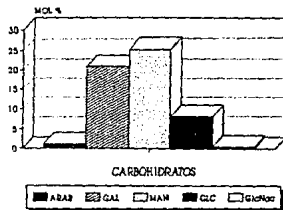
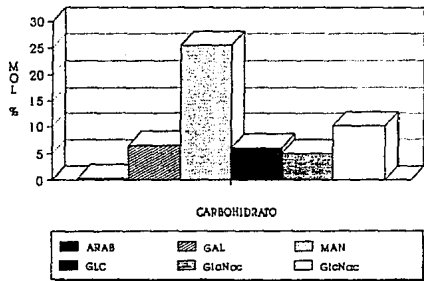
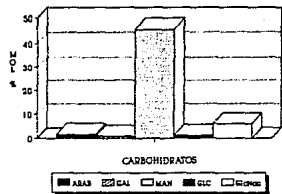


FIGURA No. 11

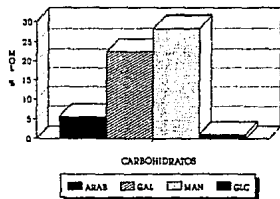
COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG
DE L.MEXICANA CEPA H.F. TOTAL CON A



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG
DE L.MEXICANA CEPA EF 7H CON A



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG
DE L.MEXICANA CEPA EF 7H CON A



CUADRO 12. COMPOSICION SACARIDICA DE LA CEPA LCD PURIFICADA CON CON A

Carbohidrato	Ext.Total	F II	F III
Galactosa	4.5	3.2	5.1
Manosa	12.2	28.0	10.2
Glucosa	2.6	-	-
GlcNac	8.2	1.0	-

valores expresados en Mol % considerando un P.M. de 10 kDa.

Se puede apreciar que para todos los casos los carbohidratos mas abundantes son manosa y galactosa en todas las fracciones y todas las cepas y el mas escaso es la glucosamina. La cepa Yucatán y Soberano tienen Xilosa en la LPG total, mas no en las fracciones purificadas y la cepa H.F. junto con la Soberano son las únicas que tienen N-aceti D-Galactosamina en la LPG total. Por último la cepa Soberano es la única cepa que tiene una pequeña proporción en la molécula de Ac. N-Neuramínico, solamente presente en la LPG total.

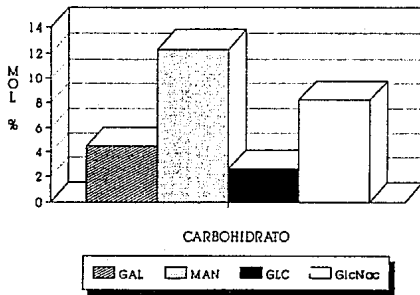
2. CARACTERISTICAS BIOLOGICAS

2.a) EFECTO DE LA LPG SOBRE LA FAGOCITOSIS

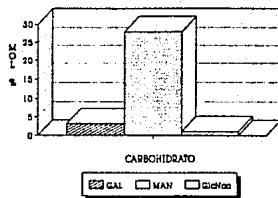
En el modelo de fagocitosis que se utilizó, se aprecia una disminución del índice fagocítico de 67 % para el control contra el 15 % en los macrófagos peritoneales murinos, incubados con 2

FIGURA No 12

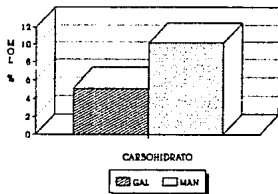
COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG
DE L. MEXICANA CEPA LCD EXTRAC. TOTAL



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG
DE L. MEXICANA CEPA LCD F II CON A



COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LA LPG
DE L. MEXICANA CEPA LCD F III CON A



$\mu\text{g/ml}$ y de cerca del 25 % para los macrófagos incubados con 0.4 $\mu\text{g/ml}$, tanto para las 2 fracciones purificadas con la lectina de Con A como para la LPG total. En cambio para concentraciones mayores (4 $\mu\text{g/ml}$) o menores (0.04 y 0.004 $\mu\text{g/ml}$), no hubo grandes diferencias del índice fagocítico con respecto a los macrófagos testigos, a los que no se les incubó con la LPG (fig 14 y cuadro 13).

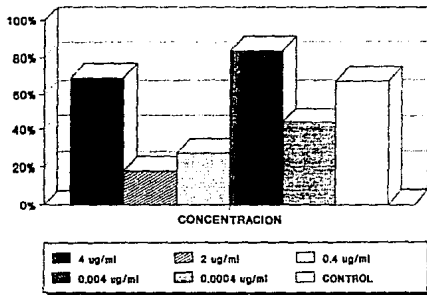
Al incubar previamente durante 10 minutos los macrófagos peritoneales con la solución 0.2 M de αMH , antes de adicionar la LPG a concentraciones de 2 y 0.4 $\mu\text{g/ml}$, se observó que el índice fagocítico con respecto al control, no presentaba variaciones importantes, por lo que parece que la manosa adicionada a los macrófagos bloquea los receptores antes de que se le agregue la LPG, por lo que hay una competencia por los mismos receptores (cuadro 14).

CUADRO 12. INDICE FAGOCITICO DE MACROFAGOS PREINCUBADOS CON LPG DE LA CEPA LCD.

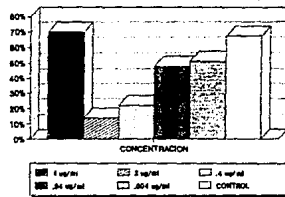
CONCENTRACION	E.TOTAL	FII	FIII
4 $\mu\text{g/ml}$	69.0 %	70.0 %	71.0 %
2 $\mu\text{g/ml}$	17.4 %	14.7 %	15.4 %
0.4 $\mu\text{g/ml}$	26.8 %	32.5 %	37.0 %
0.04 $\mu\text{g/ml}$	83.7 %	48.7 %	82.0 %
0.004 $\mu\text{g/ml}$	44.4 %	51.5 %	91.2 %
viabilidad	93.0 %	85.7 %	89.3 %
control		67.0 %	
viabilidad control		92.5 %	

FIGURA No. 13

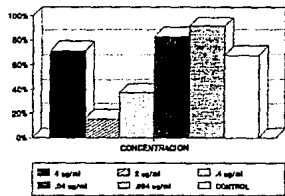
INDICE FAGOCITICO DE MACROFAGOS
INCUBADOS CON EXT. TOTAL DE LPG



INDICE FAGOCITICO DE MACROFAGOS
INCUBADOS CON LPG F II



INDICE FAGOCITICO DE MACROFAGOS
INCUBADOS CON LPG F III



CUADRO 16. EFECTO DEL α -METIL MANOSIDO SOBRE LA ACTIVIDAD FAGOCITICA DE MACROFAGOS INCUBADOS CON LA LPG.

CONCENTRACION	E.TOTAL	FII
2 μ g/ml + α MM	54.5 %	54.5 %
0.4 μ g/ml + α MM	67.4 %	66.9 %
control manosa	13.2 %	
control eritrocitos	67.0 %	

2.b) EVOLUCION DE LESIONES EN RATONES

Después de inmunizar con la LPG y retar los ratones Balb/c con la Leishmania, se comenzaron a manifestar alteraciones en las patas de los ratones a partir de la 20. semanas posterior a la inoculación del parásito. En primer lugar hubo un engrosamiento paulatino del diámetro de las patas infectadas, el cual se midió con un bernier cada 15 días. A partir de la 6 semana de evolución, aparecieron ulceraciones, las cuales empezaron a cicatrizar durante la 8 semana y finalmente presentaron una cicatrización muy marcada, la que permaneció durante todo el período de observación.

Al grupo de ratones a los que previamente se les inmunizó con el Factor Excretor por la vía subcutánea junto con Adyuvante Completo de Freund (grupo 3), las lesiones comenzarán a aparecer casi

simultáneamente que en los demás grupos, pero la diferencia fué que las lesiones que se desarrollaron en la pata infectada fueron significativamente mayores en extensión, a la de los otros 3 grupos. También se presentó diseminación en la otra pata, en la cola y en la cara principalmente a partir de la 6 ta. semana. El grupo de ratones que fueron inmunizados por la vía subcutánea con el Factor Excretor pero sin adyuvante (grupo 2), las lesiones que presentaron fueron mucho menores, comparandolos con los ratones testigos. Para los ratones a los que se les administró el Factor Excretor por vía intraperitoneal (grupo 1), el desarrollo de lesiones fué mínimo y a partir de la 10ma. semana empezaron a curar espontáneamente. (fig 15).

Finalmente los ratones a los que únicamente se les aplicó el Adyuvante Completo de Freund por vía subcutánea (grupo 4), la evolución de las lesiones fué muy similar a los ratones testigos (grupo 5), cuadro 17.

CUADRO 17. EVOLUCION DEL DIAMETRO DE LAS LESIONES DE LAS PATAS DE LOS RATONES INMUNIZADOS CON LPG POR DIVERSAS VIAS.

NO. SEMANA	GPO 1	GPO 2	GPO 3	GPO 4	TEST-GPO 5
1	0.1	0	0	0	0.04
2	0.2	0.22	0.23	0.03	0.42
4	0.41	0.41	0.67	0.5	0.77
6	0.6	0.67	1.22	0.7	0.8
8	0.61	0.77	1.67	1.4	1.3
10	0.63	0.98	2.03	1.5	1.41
12	0.28	1.22	2.55	1.7	1.77

valores expresados en cm.

$p < 0.5$

LESIONES EN PATAS DE RATONES BALB/C
 INFECTADOS CON L.MEXICANA MEXICANA
 CEPA SOBERANO

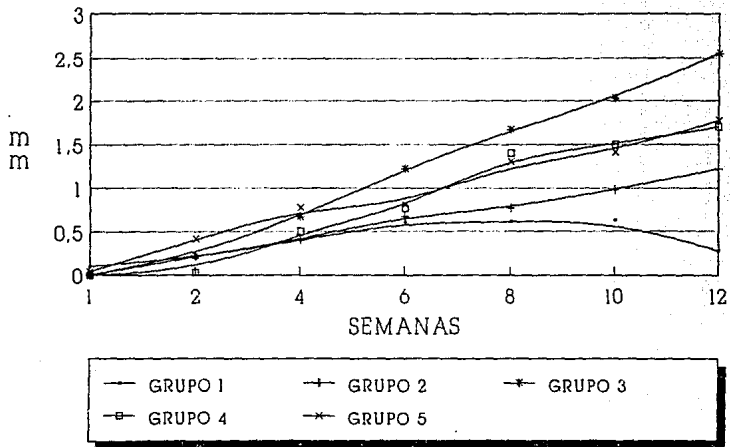


FIGURA 15

HISTOPATOLOGIA

Se revisó únicamente las lesiones de los ratones testigos con la finalidad de confirmar la existencia del parásito en las lesiones y descartar que las lesiones tuvieran un origen bacteriano.

Se encontró en las lesiones un gran número de macrófagos vacuolados con numerosos amastigotes en su interior, además de múltiples eosinófilos y algunos neutrófilos. También se observaron zonas de necrosis en dermis y epidermis.

D I S C U S I O N

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar el Factor Excretor de *Leishmania mexicana mexicana* de diversas cepas que ya se tenían aisladas y tipificadas por medio de isoenzimas e hibridación del DNA, la caracterización se realizó en el centro de referencia de la O.M.S, en la Medicine Tropical and Hygiene School.

Estas cepas provocan manifestaciones clínicas diferentes y la evolución de la enfermedad tiene distinto pronóstico en cada caso. En este trabajo se utilizaron 4 cepas, 2 de las cuales pertenecen a la misma localidad geográfica; la cepa Soberano y la cepa LCD, ambas de Cárdenas, Tabasco, la primera provoca leishmaniasis cutánea diseminada con cura espontánea y la otra leishmaniasis cutánea localizada sin cura espontánea. Por ese motivo se consideró la importancia de analizar, purificar y conocer la composición sacarídica de una de las molécula de la superficie del parásito, que pueden estar interviniendo de manera importante en este proceso la cual se le ha identificado como una lipofosfoglicana denomina Factor Excretor.

En cuanto a las curvas de crecimiento de los promastigotes de cada una de las cepas, se observó que el número de parásitos por ml era diferente para cada cepa bajo las mismas condiciones de cultivo. Esto sugiere que cada cepa posee características metabólicas diferentes que les permitan aprovechar mejor los nutrientes del medio para crecer y reproducirse.

Inicialmente se realizó una evaluación del efecto de la LPG en la evolución de la parasitosis en ratones susceptibles a la infección, como lo son los ratones singénicos Balb/C, de acuerdo a los datos de Pérez, (1979).

Los ratones fueron inmunizados con la LPG via intraperitoneal (grupo 1), subcutánea (grupo 2) y subcutánea mas adyuvante completo de Freund (grupo 3) y posteriormente retados con promastigotes metacíclicos de Leishmania mexicana mexicana. Las lesiones desarrolladas en las patas de los ratones del grupo 2 fueron menores que las lesiones que presentaron los ratones testigo (grupo 5) inoculados unicamente con leishmania, además de evolucionar hacia la curación.

Sin embargo los ratones del grupo 3 presentaron lesiones de mayor volumen que el grupo 5, además de diseminarse hacia la otra pata , la cola y la cara. Por lo contrario el grupo 4 (ratones inmunizados unicamente con el Adyuvante sin la LPG antes de la infección), presentaron lesiones similares a los ratones testigos del grupo 5. Finalmente en los ratones del grupo 1, la infección fue muy leve a comparación con los testigos.

La vía de administración de la LPG es importante para obtener una respuesta protectora contra la infección de Leishmania, como también lo demostrarón Alexander y Rousell (1989), quienes encontraron que la vía intraperitoneal es la mejor para la aplicación de vacunas contra el parásito. Estos datos sugieren que la LPG es capaz de inducir una respuesta protectora en ratones susceptibles.

Por otro lado se realizarón estudios histopatológicos de las lesiones desarrolladas en las patas de algunos ratones para descartar que las lesiones fueran de origen bacteriano. Los hallazgos muestran un gran número de macrófagos parasitados con amastigotes de Leishmania.

La purificación de la LPG se realizó mediante cromatografía de afinidad con lectinas, puesto que esta molécula esta constituida en gran proporción por estructuras sacaridicas. Se aprovecho la capacidad de las lectinas de tener gran afinidad y especificidad

estereoquímica a las moléculas de carbohidratos específicas (Sharon and Lis 1989). Las lectinas tienen la gran ventaja de tener una fuerza de asociación muy baja (1.5×10^6 M⁻¹ s⁻¹), lo que permite recuperar perfectamente las estructuras sacarídicas que se purifican, sin alterar su estructura tal como lo describen Lis y Sharon (1986).

En este estudio se utilizaron las lectinas Con A y lenteja debido a que se conoce su especificidad por estructuras que contengan manosa y glucosa y son capaces de identificar pequeñas modificaciones estructurales de una cadena oligosacárida y en los análisis de la composición de los carbohidratos realizada por Ilg, (1992) para la LPG de *L. mexicana* y por otros autores para otras especies de *Leishmania* se estableció que contenían manosa en grandes proporciones.

La capacidad de las lectinas para reconocer y aglutinar *Leishmanias* fué inicialmente descrito por Dwyer (1974) y Dawidowicz (1975) y posteriormente por Shottelius (1981), quien las utilizó como una alternativa para tipificar las especies de *Leishmania* del viejo y nuevo mundo.

La lectina Con A reconoce y tiene una alta afinidad por una estructura bicatenaria, constituida por un centro trimanosídico, sustituido por 2 residuos de GlcNac; si estos residuos son sustituidos por otro azúcar como la galactosa, la afinidad disminuye. La lectina de lenteja reconoce estructuras parecidas pero con residuos de galactosa en la porción terminal, además requiere de fucosas para tener una elevada afinidad (Debray, 1981).

Utilizando a la lectina de Con A como matriz de afinidad fue posible purificar 2 fracciones para cada cepa. Una fracción retenida por la lectina (FII) y eluida de la columna adicionando α -Metil Manósido al 0.2M. La otra fracción purificada (F III), fué eluida de la misma columna con ácido acético al 3 %.

Estos resultados indican que el mecanismo de interacción de la lectina con cada fracción es diferente, mientras que en el primer caso el reconocimiento es dirigido únicamente por la interacción de los carbohidratos por esa razón fué posible eluir con el azúcar específico. En el segundo caso los resultados sugieren la presencia de otro tipo de interacciones adicionales entre la lectina y los carbohidratos, las cuales pueden ser de tipo hidrofóbico, por lo que se requiere para la elución de la F III, la disminución del pH del medio cromatográfico con el ac. acético al 3% , con lo cual se modifica únicamente la estructura terciaria de la lectina y la consecuente modificación alostérica de los sitios receptores para los carbohidratos de las fracciones eluidas. (Lis and Sharon,1986).

La lectina de lenteja no tuvo afinidad por las estructuras sacarídicas de la LPG, lo que indica que estas moléculas no contienen fucosa, ni galactosa en posición terminal. Los datos aportados con la Con A permite establecer que las 2 fracciones purificadas con esta lectina deben tener secuencias $\alpha(1-3)\text{Man-Man}$ en alguno de sus extremos libres.

Si se compara estos datos con las estructuras propuestas para la LPG de *L. donovani* por Turco (1898) y Thomas (1992), la de *L. major* por Mc Conville (1990), para *L. mexicana* por Ilg (1992), este tipo de moléculas tienen una estructura lineal, por lo tanto solo existen 2 sitios probables de reconocimiento, en los cuales se pueda encontrar Manosa-Manosa en posición terminal. El primero en la región de las unidades de repetición de oligosacaridos y el segundo en el CAPS. De acuerdo a la estructura propuesta por Ilg (1992), para *L. mexicana*, en la porción del CAP existe una gran cantidad de secuencias Man-Man, por lo que seguramente el reconocimiento por Con A corresponde a este sitio.

Las estructuras propuestas por otros autores para la LPG de varias especies, parecen ser similares para todas conteniendo 2 regiones altamente conservadas y dos variables, las cuales son: para las

regiones conservadas un núcleo heptasacárido (conteniendo 3Galp, 2Manp, GlcNac y 1 Glc) y una parte lipídica constituida por liso-alkil fosfatidil inositol (F-I), el cual puede estar anclado a la membrana de la Leishmania, y una de las partes variables consta de unidades repetitivas de oligosacáridos, las que tienen un corazón común de (PO4-6Gal β 1,4 Man α 1) en cada unidad y las cuales pueden tener, o no, ramificaciones. Los oligosacáridos de estas unidades parece ser especie específico, en estudios recientes se ha demostrado que esta cadena tiene una estructura helicoidal (Sacks,1992). En el extremo no reducido de la molécula de la región sacarídica se encuentra un oligosacárido neutro (CAP), que para L. major, contiene la secuencia Man α 1-2Man α 1 (Sacks, 1992), en el caso de L. donovani este CAP presenta heterogeidad teniendo 5 secuencias (2 de ellas son di y 3 trisacáridos) diferentes, todas ricas en manosa, pero la estructura mas abundante contiene un trisacárido ramificado Gal β 1-4(Man α 1-2)Man. (Thomas, 1992) y para L. mexicana el CAP se encuentran 1 di y 2 trisacáridos (Man α 1-2Man, Man α 1-2Man α 1-2Man y Man α 1-2[Gal β 1- 4]Man), (Ilg, 1992).

Es interesante mencionar que los datos aportados por las inmunodifusiones en placas de agar (Oüchterlony), muestran que las F II purificadas con la Con A de todas las cepas estudiadas en este trabajo poseen aparentemente epitopes inmunodominantes , que son comunes para toda las cepas y que en base a los datos obtenidos por la purificación con Con A esos epitopes pueden ser carbohidratos, posiblemente manosa y galactosa. Slutzky (1979) encontró que la galactosa forma parte del sitio de reconocimiento de anticuerpos contra la LPG. Por otra parte unicamente en la F III de la cepa Soberano y la cepa H.F. también se encuentran moléculas inmunodominantes, las que posiblemente comparten estructuras con los epitopes identificados en F II. La identificación y caracterización de estas estructuras podrían ser de gran valor para ser utilizadas en estudio para la elaboración de vacunas y pruebas diagnósticas específicas, ya que la LPG, parece ser una molécula altamente antigénica y pudiera ser una alternativa para la

elaboración de una vacuna contra la Leishmaniasis. Además es importante establecer si las fracciones obtenidas con la Con A son capaces de conferir protección para producir vacunas a partir de las fracciones de la LPG.

El aislamiento de componentes oligosacáridos de la LPG con lectinas presenta muchas ventajas en comparación con otros métodos fisicoquímicos es más simple, rápida y económica y el mecanismo de reconocimiento es reversible. Con esto se abre una amplia gama de posibilidades de estudio sobre este Factor Excretor o LPG.

Este es el primer trabajo en el que se utiliza la lectina de Con A en la purificación y caracterización de las fracciones aisladas de LPG. La composición sacarídica para cada una de las fracciones purificadas por la Con A es diferente (cuadro 16), pero en las LPGs totales de cada cepa y en cada una de las fracciones, el carbohidrato más abundantes es la manosa.

CUADRO 16. CARBOHIDRATOS PRESENTES EN LA LPG DE LAS CEPAS DE L. MEXICANA

CEPA YUCATAN	H.F.	SOBERANO	LCD
ARA	ARA	ARA	GAL
GAL	GAL	GAL	MAN
MAN	MAN	MAN	GlcNac
GlcNac	GlcNac	GlcNac	GLC
GLC	GLC	GLC	
XIL	GALNAC	XIL	
		NANA	
		GALNAC	

Si comparamos estas composiciones sacarídicas con las reportadas por otros autores para las especies *L. donovani* (Thomas, 1992), *L. major* (Mc. Conville, 1990) y *L. mexicana* (Ilg, 1992) encontramos (cuadro 17).

CUADRO 17. CARBOHIDRATOS PRESENTES EN LA LPG DE ALGUNAS ESPECIES DE LEISHMANIA

<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>
MAN GAL GlcNac GLC	MAN CAL GlcNac ARA	MAN CAL GlcNa GLC

Es evidente que existen diferencias en la LPG de las cepas de *L. mexicana*, así como entre especies. La composición de la LPG de la *L. mexicana* de acuerdo con los datos de Ilg, 1992 contiene todos los carbohidratos presentes en las 4 cepas analizadas en este trabajo, pero en 3 de las 4 cepas existen carbohidratos adicionales no reportados por Ilg, los cuales son:

- Cepa Soberano : Arabinosa, N-acetil-Galactosamina (GalNac), Ac N-acetil-neuramínico (NaNa) y Xilosa.
- Cepa H.F. : Arabinosa y N-acetil-Galactosamina.
- Cepa Yucatán : Arabinosa y Xilosa.

La cepa LCD es la única que tiene los mismos carbohidratos que la LPG de *L. mexicana* reportada por Ilg (1992).

Cabe resaltar que la única cepa que presentó residuos de Ac. N-acetil-neuramínico fué la Soberano, aunque este está en pequeñas proporciones. Los azúcares mas abundantes para todas las cepas analizadas fueron manosa y galactosa, estos datos coinciden con los reportados para las otras especies de *Leishmania* y entre los mas escasos esta la N-acetil-Glucosamina, la cual probablemente solo se encuentre formando parte integral del núcleo heptasacárido fosforilado.

La LPG caracterizada por otros autores para las 3 especies de *Leishmania* anteriormente referidas, se encuentra en la región del CAP la secuencia Man α 1-2 Man α 1, y según Thomas (1992) esto podría indicar la existencia de una Man (α 1-2)manosil-transferasa en el parásito. Esta enzima puede actuar para detener la elongación de la LPG, con la formación de una cadena terminal conteniendo el oligosacárido Man α 1-2Man. Estos datos pueden ser apoyados por los recientes hallazgos de Sacks (1990) en la LPG de *L. major*. en los cuales la LPG duplica su tamaño durante la metacicloogénesis de promastigote en la fase de crecimiento logarítmica (no infectiva), a fase estacionaria con organismos infectivos. Sacks menciona en su artículo, que esta elongación de la LPG, puede ayudar al parásito a evadir el daño causado por el complemento sobre todo por C5-9, porque siendo la LPG una molécula tan grande, habría un impedimento estérico para que los componentes del complemento llegon a la membrana del parásito. Por lo anterior la manosiltransferasa puede ser una enzima clave en la regulación de la biosíntesis de la LPG.

Con estos datos se puede sugerir una distribución aproximada de los carbohidratos encontrados en las LPG de las cepas estudiadas de *Leishmania mexicana* y solo existen dos sitios probables donde puede haber variación en los carbohidratos; la región de unidades de

repetición sacarídica y el CAP. El CAP podría estar constituido para todas las cepas analizadas por la secuencia Man-Man, por lo que es probable que este sea el sitio de reconocimiento de la lectina de Con A. La propuesta de estructura de la LPG de las 4 cepas de *L. mexicana* estudiadas en este trabajo se muestra en la fig 16 y el cuadro 17.

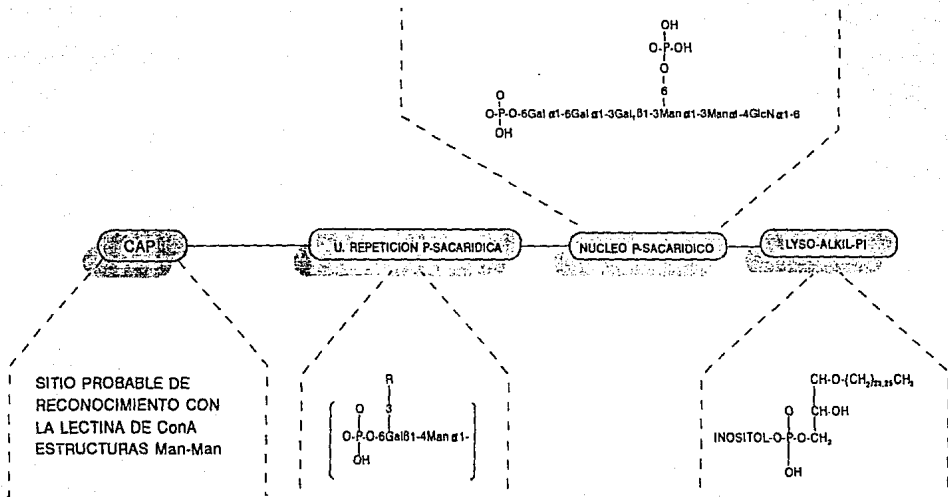
CUADRO 17. PROPUESTA DE COMPOSICION DE LAS UNIDADES DE REPETICION DE OLIGOSACARIDOS DE LAS LPG DE LAS 4 CEPAS DE *L.MEXICANA*

CEPA	SOBERANO	H.F.	YUC	LCD
	MAN	MAN	MAN	MAN
	GAL	GAL	GAL	GAL
	ARAB	ARAB	ARAB	
	XIL		XIL	
	GalNac	GalNac		

La GlcNac presente en cada capa se esta considerando como parte del núcleo heptasácarido, ya que se encuentra en mínimas proporciones.

La gran variación en la composición de azúcares entre especies y cepas indica la enorme diversidad biológica que existe en la naturaleza, y que cada ser tiene una característica y función única, por lo que no solo a nivel de composición sacarídica existen diferencias, sino también a nivel genético, molecular, inmunológico, etc, pero es necesario conocer cada una de estas facetas poder entender las diferentes manifestaciones clinicas y

FIG. 16 ESTRUCTURA PROPUESTA PARA LAS 4 CEPAS DE *Leishmania mexicana*



los pronósticos de las leishmaniasis, los cuales son muy inciertos en muchas ocasiones.

Aun no se conoce bien la relación estructura-función de la LPG, se supone que una de las principales funciones es en el reconocimiento y entrada al macrófago, por lo que se realizó un ensayo sobre el efecto directo de la LPG en la fagocitosis utilizando como modelo la fagocitosis de eritrocitos de carnero, debido a que en la superficie de la leishmania existen otras moléculas como la gp63 y el glicosilfosfatidil inositol (GLPs), que también participan en la interacción con macrófagos. En este estudio se encontraron diferencias importantes en el índice fagocítico (IF) de los macrófagos incubados con diferentes concentraciones de la LPG. Los macrófagos incubados con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la LPG para las 2 fracciones purificadas con la lectina y para la LPG total no muestran diferencias con respecto al control. En cambio a concentraciones entre 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y de 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hay una disminución significativa del IF de aproximadamente del 50%. Finalmente para concentraciones menores de 0.4 tampoco hubo diferencias importantes con respecto al control. Esto último se podría deber a que la cantidad de la LPG es tan pequeña que no es capaz de inducir algún efecto biológico. Se utilizó la concentración inicial de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en base al trabajo de Alexander y Russell (1989).

Esta respuesta de los macrófagos pre-incubados con la LPG ante los eritrocitos puede explicarse haciendo una analogía con el trabajo de Tartaglia (1992), para los receptores del Factor Necrosante de Tumores (TNF). En este trabajo se reconocen 2 tipos de receptores para el TNF en las células, uno de baja afinidad (R1) y otro de alta afinidad (R2), en los que una concentración baja de TNF induce un efecto específico y una concentración alta induce otro. Dichos receptores comparten cierto grado de homología en los dominios extracelulares, pero no en los dominios intracelulares. Estos 2 tipos de receptores son redundantes en algunas de sus funciones, pero si se bloquea R1 con un anticuerpo monoclonal, se neutralizan

o bloquean solo algunos de los efectos del TNF, pero otros no. Esto sugiere que cada receptor induca una serie de cambios, que en ocasiones son los mismos. También se ha reconocido que la unión del TNF unicamente a R2, no es suficiente para estimular la serie de procesos que induce este inmunoregulador, por lo que se considera que el R1 tiene un papel relevante.

En el modelo de Tartaglia (1992), las señales para R1 producen una gran cantidad de efectos biológicos como citotoxicidad, inducción de la superóxido dismutasa manganeso y la inducción de NF-KB, mientras que para R2, unicamente se produce la señal para la proliferación de timocitos y células T, pero a concentraciones bajas de TNF, las señales para R2, producen citotoxicidad e inducción de NF-kB. Las bajas concentraciones de TNF son reconocidas y unidas con gran afinidad a R2 mucho mejor que para R1.

En nuestro modelo de fagocitosis es posible que el receptor que esta participando en la fagocitosis mediada por la LPG sea el de manosa, por la alta concentración de ese carbohidrato en la molécula. Es probable que también existan por lo menos 2 tipos de receptores para la LPG por lo que se presentan respuestas diferentes de acuerdo a la concentración del Factor Excretor, pero hasta la fecha no hay reportes al respecto que respalden esta teoría, por lo que sería interesante hacer estudios, en los cuales se pudieran aislar y caracterizar dichos receptores. Los receptores de manosa median la endocitosis de moléculas con residuos terminales en manosa, fucosa, N-acetil-glucosamina y glucosa (Taylor, 1992).

Aunque se sabe que los receptores para manosa intervienen en el reconocimiento y penetración de la leishmania al macrófago (Wilson and Pearson 1986) no se ha estudiado a fondo la relación que existe entre la estructura de la LPG y el reconocimiento de los receptores.

En nuestros experimentos se observó que el efecto de inhibición de la fagocitosis por la LPG es revertido al agregar α -metil-manósido (α -MM) 0.2 M. Estos resultados aun no son concluyentes, sin embargo sugieren que efectivamente las moléculas aisladas de LPG participan activamente en el proceso de interacción del parásito con el hésped. Es necesario realizar experimentos en los cuales se utilicen azúcares presentes en la LPG de las cepas estudiadas, para determinar si realmente esos son los receptores que participan.

Aun quedan muchas interrogantes sobre la estructura de la LPG y de sus funciones, así como de los factores que interviene en el tropismo hacia diversos tejidos y de su consecuente patogénesis, la cual puede estar relacionada en parte a esta molécula de superficie de la Leishmania a la que se le ha atribuido participación en la sobrevivencias y virulencia del parásito, así como su colaboración en la regulación de la respuesta inmunológica del hésped.

También es importante continuar el estudio de la LPG porque es una alternativa muy prometedora para la producción de vacunas y pruebas diagnósticas específicas.

CONCLUSION

1. El Factor Excretor o lipofosfoglicana (LPG) de las cepas de Leishmania mexicana analizadas en este trabajo presentó una gran heterogeneidad en cuanto a la composición sacarídica, la cual puede encontrarse en los carbohidratos de las regiones variables de la molécula que son : las unidades de repetición de carbohidratos y la región del CAP.

Estas diferencias probablemente están relacionadas con las manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad de acuerdo a la cepa de Leishmania mexicana mexicana responsable, ya que se ha reconocido a la LPG como una molécula que interviene en la regulación inmunológica de la enfermedad, así como en la sobrevivencia y virulencia del parásito.

2. Se demostró que la utilización de lectinas para purificar la LPG presentes en la Leishmania es una herramienta útil, debido a que resulta económico, sencillo y rápido, además de que reconoce de manera específica ciertas estructuras sacarídicas, las cuales pueden ser fácilmente separadas de la lectinas sin alteración de su estructura utilizando el azúcar específico para cada caso. La lectina de Con A fué mas específica para reconocer estructuras sacarídicas de la LPG.

Esta metodología para la purificación de la LPG podría ser una buena alternativa para la identificación, caracterización y purificación de antígenos específicos de Leishmania, para ser empleada como vacuna o para el desarrollo de pruebas diagnósticas que permitan reconocer el tipo y el posible pronóstico de la leishmaniasis.

3. Los resultados indican la existencia de secuencias α 1-3 Man-Man en alguno de los extremos terminales de la LPG. En dichas moléculas se reconoció por medio de anticuerpos la presencia de epítopes

inmunodominantes para todas las cepas analizadas. Por otro lado la lectina lenteja no tuvo especificidad por las estructuras sacarídicas de la LPG, lo cual indica que no existen fucosas, ni galactosas en posición terminal

4. La LPG parece interactuar directamente con receptores en el macrófago para el proceso de fagocitosis. Dichos receptores probablemente sea para manosa, ya que la LPG analizada tiene gran cantidad de ese carbohidrato, parece existir diferente grado de afinidad al receptor, dependiendo de la concentración de la LPG utilizada.

B I B L I O G R A F I A

1. ALEXANDER J. & RUSSELL D. 1989. A NOVEL METHOD OF VACCINATION USING PARASITES MEMBRANA ANTIGENS. IN LEISHMANIASIS : THE CURRENT STATUS AND NEW STRATEGIES FOR CONTROL. ED. D.T. HART. SERIE A : LIFE SCIENCE VOL. 163. PLENUM PRESS. NEW YORK.
2. BEAVER P., JUNG R. & CUPP E. 1990. PARASITOLOGIA CLINICA. 2A. EDICION. SALVAT EDITORES. MEXICO. P : 881.
3. BODGAN C., ROLLINGHOFF M. & SOLBACH W. 1990. EVASION STRATEGIES OF LEISHMANIA PARASITES. PARASITOL. TODAY. 6 (6) : 183-187.
4. BORDIER C. 1987. THE PROMASTIGOTE SURFACE PROTEASE OF LEISHMANIA. PARASITOL. TODAY. 3 (5) : 151-153.
5. CHAKREBORTY P. & DAS P. 1988. THE ROLE OF MANOSA / N-ACETILGLUCOSAMINA RECEPTORS IN BLOOD CLEARANCE AND CELLULAR ATTACHMENT OF LEISHMANIA DONOVANI. MOL. BIOCHEM. PARASITOL. 28:55-62.
6. CHANG K.P. 1981. LEISHMANIA DONOVANI MACROPHAGE BINDING MEDIATE BY SURFACE GLYCOPROTEINS ANTIGENS: CHARACTERIZACION IN VITRO BY RADIOISOTOPIC ASSAY. MOL. BIOCHEM PARASITOL. 4: 67-71.
7. CHANG K-P. & CHAUDHUIR G. 1990. MOLECULAR DETERMINANTS OF LEISHMANIA VIRULENCE. ANN. REV MICROBIOL. 44: 499-529.
8. CHANNON J. & BLACKWELL J. 1986. MOLECULAR BIOLOGY OF LEISHMANIA. PARASITOL. TODAY. 2 (2) :45-
9. CHAUDHUIRI G, CHAUDHUIRI M., PAN A. & CHANG K-P. 1989. SURFACE ACID PROTEINASE (GP63) OF LEISHMANIA MEXICANA. AMETALLOENZYME CAPABLE OF PROTECTING LIPOSOME ENCAPSULATE PROTEIN FROM

PHAGOLYSOSOMAL DEGRADATION BY MACROPHAGES. J. BIOL. CHEM. 264: 7483-89.

10. DEBRY H., DECOUT D. & STRECKER G. 1981. SPECIFICITY OF THE LECTINS TOWARDS OLIGOSACCHARIDES AND GLYCOPEPTIDES RELATED TO N-GLYCOSYLPROTEINS. EUR. J. BIOCHEM. 117: 41-55.

11. DWYER D. 1974. LECTIN BINDING SACCHARIDES ON A PARASITIC PROTOZOAN. SCIENCE. 184 : 471-472.

12. FUENTES I. 1993. INMUNOBIOLOGIA DE LA INFECCION DE RATONES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES CON 3 CEPAS DE LEISHMANIA PRODUCTORAS DE LESIONES DIFUSAS. TESIS PROFESIONAL. ESC. NAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, I.P.N.

13. GARCIA C. 1993. REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN CEPAS SINGENICAS DE RATON CON DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD A LEISHMANIA MEXICANA. TESIS PROFESIONAL. ESC. NAL. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, I.P.N.

14. HANDMAN E. & GREENBLATT C. 1977. PROMOTION OF LEISHMANIAL INFECCION IN NON PERMISSIVE HOST MACROPHAGE BY CONDITIONED MEDIUM. Z. PARASITENKD. 53: 143.

15. HANDMAN E., SCHNUR L., SPITHILL T. & MITCHEL G. 1986. PASSIVE TRANSFER OF LEISHMANIA LIPOPOLYSACCHARIDE CONFERS PARASITE SURVIVAL IN MACROPHAGE. J. IMMUNOL. 11: 3608-3613.

16. IIG T., ETGES R., OVERATH P., MC CONVILLE M., OATES J., HOMANS W. & FERGUSON M. 1992. STRUCTURE OF LEISHMANIA MEXICANA LIPOPHOSPHOGLYCAN. J. BIOL CHEM. 267 (10) : 6834-6840.

17. LEVIN ET AL. 1980. A NEWLY REVISED CLASSIFICATION OF THE PROTOZOA. J. PROTOZOOLOGY. 27 (1) : 37-58.

18. LIS H. & SHARON N. 1986. LECTINS AS MOLECULES AND AS TOOLS. ANN. REV.BIOCHEM. 55 : 35-67.
19. MAUEL J. 1990. MACROPHAGE-PARASITE INTERACTIONS IN LEISHMANIA INFECTIONS. J.LEU. BIOL. 47 : 187-193.
20. MC. CONVILLE M., OATES T.,FERGUSON M & HOMANS S. 1990. STRUCTURE OF LIPOPHOSPHOGLYCAN FROM LEISHMANIA MAJOR. J. BIOL. CHEM. 265 (32) 19611-19623.
21. MC NEELY T., ROSENG., LONDNER M. & TURCO S. 1989. INHIBITORY EFFECTS ON PROTEIN KINASE C ACTIVITY BY LIPOPHOSPHOGLYCAN FRAGMENTS AND GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL ANTIGEN OF THE PROTOZOAN PARASITES LEISHMANIA. BIOCHEM J. 259: 601- 604.
22. MONROY A. 1986. RELACION HUESPED-PARASITO EN LEISHMANIASIS. INFECTOLOGIA. 6 (7) : 230-237.
23. MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B.,SPIK G. & STRECKER G. 1986. CHAP. 5. GLYCOPROTEINS PP. 178-181. IN CARBOHYDRATE ANALISIS A PRACTICAL APPROACH. CHAPLIN M.F. & KENNED J.F. IRL PRESS.
24. MOSSER D. & EDELSON J. 1987. THE THIRD COMPONENTE (C 3) IS RESPONSABLE FOR THE INTRACELLULAR SURVIVAL OF THE L. MAJOR. NATURE 327 : 329-331.
25. NAGAKURA K., TACHIBANA H., KANEDA Y. & NAKAE T. 1986. LEISHMANIA BRAZILIENSIS : LOCALIZATION OF GLYCOPROTEINS IN PROMASTIGOTE. EXP. PARASITOL. 61 : 335-342.
26. PEREZ H., LABRADOR F. & TORREALBA J. 1979. VARIATIONS IN THE REPOSE OF FIVE STRAINS OF MICE TO LEISHMANIA MEXICANA. INT. J. PARASITOL. 9 : 27-32.

27. REMINGTON C. 1940. METHOD FOR DETERMINATION OF SUGAR. *BIOCHEM J.* 34 : 931-933.
28. RIVAS B., 1989. ESTUDIO INTEGRAL DE LA RESPUESTA INMUNE MURINA A UNA CEPA DE LEISHMANIA MEXICANA MEXICANA AISLADA DE UN CASO DE LEISHMANIASIS CUTANEA DISEMINADA. TESIS PROFESIONAL. ESC. NAL. CIENCIAS BIOLÓGICAS. I.P.N.
29. RUSSELL D & TALAMAS P. 1989. LEISHMANIA AND THE MACROPHAGE : A MARRIAGE OF INCONVENIENCE. *IMMUNOL. TODAY* 10 (10) ; 328-333.
30. SACKS D. 1992. THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE SURFACE LIPOPHOSPHOGLYCAN ON DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES OF LEISHMANIA PROMASTIGOTES. *INFECT. AGENTS AN DISEASE.* 1 : 200-206.
31. SCHMIDT G & ROBERT L. 1984. FUNDAMENTOS DE PARASITOLOGIA. 1o. EDICION. ED. C.E.C.S.A. MEXICO. 63-91.
32. SHOTTELIUS A. 1981. LECTIN TYPING OF LEISHMANIA STRAIN FROM THE NEW AND OLD WORLD. 4th. LECTIN MEETING IN COPENHAGEN. JAN 8-12.
33. SHARON N. & LIS H 1989. LECTINS AS CELL RECOGNITION MOLECULES. *SCIENCE.* 246 : 227-246.
34. SLUTZKY G., EL-ON J. & GRENBLATT C. 1979. LEISHMANIA EXCRETED FACTOR : PROTEIN BOUND AND FREE FORMS PROMASTIGOTE CULTURE OF L. TROPICA AND L. DONOVANI. *INFECT. IMMUN.* 26 : 916-924.
35. SLUTZKY G. & GREENBLATE C. 1982. IDENTIFICATION THE GALACTOSE AS THE IMMUNODOMINANT SUGAR OF LEISHMANIA EXCRETED FACTOR AND SUBSEQUENT LABELING WHIT GALACTOSE OXIDASE AND SODIUM BORO [3H]HYDRIDE. *INFECTION AND IMMUN.* 37 (1) : 10-14.
36. TARTAGLIA L. & GOEDDEL D. 1992. TWO TNF RECEPTORS. *IMMUNOL. TODAY.* 13 (5) : 151-153.

37. TAYLOR M., BEZOUSKA K. & DRICKAMER K. 1992. CONTRIBUTION TO LIGAND BINDING BY MULTIPLE CARBOHYDRATE-RECOGNITION DOMAINS IN THE MACROPHAGE MANNOSE RECEPTOR. J. BIOL. CHEM. 267 (3) : 1719- 1726.
38. THOMAS J., MC CONVILLE M., THOMAS-OATES J., HOMANS S., FERGUSON J., GORIN P., GREIS K. & TURCO S. 1992. REFINED STRUCTURE OF THE LIPOPHOSPHOGLYCAN OF LEISHMANIA DONOVANI. J. BIOL. CHEM. 267 (10) : 6829-6833.
39. TURCO S. 1989 a. THE LEISHMANIA DONOVANI LIPOPHOSPHOGLYCAN : STRUCTURE AND FUNCTION. IN LEISHMANIASIS. THE CURRENT STATUS AND NEW STRATEGIES FOR CONTROL. ED. D.T. HART. SERIE A ; LIFE SCIENCE VOL. 163. PLENUM PRESS. NEW YORK.
40. TURCO S. 1989 b. THE LIPOPHOSPHOGLYCAN OF LEISHMANIA. PARASITOL. TODAY. 4 (9). 255-257.
41. TURCO S., ORLANDI P., HOMANS S., FERGUSON A., DWEK R & RADENACHER T. 1989. STRUCTURE OF THE PHOSPHOSACCHARIDE-INOSITOL CORE OF THE LEISHMANIA DONOVANI LIPOPHOSPHOGLYCAN. J. BIOL CHEM. 264 (12). 6711-6715.
42. TURCO S. 1990. THE LEISHMANIAL LIPOPHOSPHOGLYCAN : A MULTIFUNCTIONAL MOLECULE. EXP. PARASITOL. 70 :241-245.
43. TURCO S. & SACKS D. 1991. EXPRESION OF THE STAGE-SPECIFIC LIPOPHOSPHOGLYCAN IN LEISHMANIA MAJOR AMASTIGOTES. MOL. AND BIOCHEM. PARASITOL. 45 : 91-100.
44. VELASCO O. 1987. LA LEISHMANIASIS EN MEXICO. REV. LAT-AMER. MICROBIOL. 29 : 119-126.
45. VELASCO O. 1989. LOS AGENTES ETIOLOGICOS DE LAS LEISHMANIASIS EN MEXICO. PRESENCIA DE L. BRAZILIENSIS. REV. LAT- AMER MICROBIOL.

31 : 231-234.

46. VELASCO O. 1991. LAS LEISHMANIASIS CON ESPECIAL REFERENCIA A MEXICO. PUBLICACIONES TECNICAS DEL INDRE No.7. DIRECCION GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA. S.S.

47. WHO.1990. TROPICAL DISEASES. WHO DIV. CONTOL TROPICAL DISEASES. WND/WORLD. BANK/ WHO. SP. PROG. RESEARCH. TRAN. TROP. TDR.

48. WILLIAMS K., SACCI J. & ANTHONY R. 1986. IDENTIFICATION AND RECOVERY OF LEISHMANIA ANTIGEN DISPLAY ON THE SURFACE MEMBRANE OF MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES INFECTED IN VITRO. J. IMMUNOL. 136 : 1853-1858.

49. WILSON M & PEARSON R. 1986. EVIDENCE THAT LEISHMANIA DONOVANI UTILIZES A MANNOSA RECEPTOR ON HUMAN MONONUCLEAR PHAGOCYTES TO ESTABLISH INTRACELLULAR PARASITISM. J. IMMUNOL. 136 (12) : 4681-4688.

50. WILSON M. & HARDIN K. 1988. THE MAJOR CONCAVALINA A-BINDING SURFACE GLYCOPROTEIN OF LEISHMANIA DONOVANI CHAGASI PROMASTIGOTES IN INVOLVED IN ATTACHMENT TO HUMAN MACROPHAGES. J. IMMUNOL. 141 (1) : 265-272.

51. ZANNETA J., BRECKRIDGE W. & VICEDON G. 1972. ANALYSIS OF MONOSACHARIDES BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY OF THE O-METHYLGLYCOSIDES AS TRIFLUOROACETIC DERIVATIVES. J.CHROMATOG. 69 : 291-304.